



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE BIOMOLECOLARI E BIOTECNOLOGICHE

Indirizzo: Microbiologia Molecolare e Clinica

XXV CICLO

Direttore Prof. Bruno Masala

# **Analisi proteomica e funzionale del secreto di *Trichomonas vaginalis***

Tutor:

Prof. Pier Luigi Fiori

---

Tesi della

Dr.ssa Anna Rita Cocco

---

Il Coordinatore

Prof. Bruno Masala

---

Anno Accademico 2011-2012

# Sommario

Abstract .....	1
Introduzione.....	2
Morfologia.....	2
Genoma.....	4
Metabolismo .....	5
Epidemiologia, manifestazioni cliniche .....	6
<i>T. vaginalis</i> e infiammazione. ....	8
<i>T. vaginalis</i> e cancro.....	9
Meccanismi di patogenicità .....	12
Il secretoma di <i>T. vaginalis</i> .....	15
Scopo del lavoro .....	17
Materiali e metodi.....	18
Preparazione del secreto .....	18
Proteomica bidimensionale e GeLC MS/MS .....	18
Identificazione delle proteine .....	19
Analisi bioinformatiche .....	19
Risultati e Discussione .....	20
Messa a punto di una metodica di secrezione ottimizzata per l'analisi proteomica .....	20
Messa a punto del protocollo di analisi in spettrometria di massa ed identificazione .....	23
Caratterizzazione del secretoma.....	25
Le Peptidasi .....	25
Proteine del trasporto degli elettroni ed omeostasi redox .....	28
Analisi differenziale.....	30
Gene Ontology: funzione .....	31
Localizzazione .....	35

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) .....	38
Conclusioni .....	42
Materiali supplementari.....	44
Analisi predizione di secrezione alternativa tramite SecretomeP .....	63
Blast con le proteine del database Exocarta .....	69

## Abstract

*Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomoniasis, one of the most common sexually transmitted diseases in humans, recently associated with severe complications such as a significantly increased relative risk of developing cervical and prostate cancer. The mechanism by which *T. vaginalis* exerts the pathogenesis is only partly characterized. It was demonstrated that several secreted molecules play a central role, but proteins implicated are never directly observed. It was observed that lysis is dependent on pH, with a peak of activity at pH 5.8. Indeed *T. vaginalis* cytolytic activity is lost when pH is raised over 6.5.

In our work, we performed a comprehensive proteomic analysis of the secreted proteins obtained at both neutral and acidic pH.

We optimised a protocol to obtain secreted proteins suitable for different proteomic approaches such as 1D and 2D electrophoresis. Our method allowed to identify in supernatants 114 and 202 proteins with heterogeneous functions obtained at pH 5.8 and 7.0, respectively.

Through bioinformatic analysis and electron microscopy, we shown that *T. vaginalis* secretes proteins via exosomes, a vesicular mediated mechanism that was not even reported in *T. vaginalis*.

We observed several differences between secretomes at pH 5.8 and 7.0, in particular for classes of proteases, of which is knows their role in pathogenesis.

We identified an ortholog for human cytokine macrophage migration inhibitory factor that can be involved in the correlation with prostate cancer.

The database constructed by this work can be a start point for studies in pathogenesis, drug discovery and development of vaccination strategies for the control of trichomoniasis.

# Introduzione

## Morfologia

*Trichomonas vaginalis* è un protozoo parassita appartenente alla classe dei flagellati e all'ordine dei Trichomonadida, descritto per la prima volta da Donné nel 1836 [1, 2].

*T. vaginalis* non forma cisti e il suo ciclo cellulare presenta il solo stadio di trofozoite. In terreni liquidi si presenta generalmente nelle forme più tipiche ovoidali, ellissoidali o sferiche, mentre in presenza di agar, di monostrati cellulari o superfici vetrose e plastiche assume spesso morfologia ameboide. Morfologie particolari si osservano talvolta nelle secrezioni vaginali e nelle urine. Anche le diverse condizioni fisico-chimiche, come la tensione di ossigeno, il pH, la temperatura possono determinare alterazioni della morfologia. Le dimensioni del protozoo variano sensibilmente, da 7 a 23  $\mu\text{m}$  di lunghezza e da 5 a 15  $\mu\text{m}$  di larghezza [3].

*T. vaginalis* ha quattro flagelli anteriori, lunghi circa 12  $\mu\text{m}$ . Un quinto flagello origina dorsalmente in prossimità degli altri quattro e viene incorporato sul margine libero di una membrana ondulante che si estende per circa due terzi della lunghezza del protozoo. L'assostile è una struttura che corre lungo l'asse anteroposteriore dell'organismo, il cui segmento terminale sporge oltre l'estremità posteriore del protozoo di circa un terzo, contribuendo a determinarne la peculiare morfologia.

Il trofozoite presenta un unico nucleo, al cui interno sono presenti 6 cromosomi, [4]. La divisione cellulare è di tipo criptopleuromitotico, con la formazione cioè di un fuso extranucleare durante la mitosi, senza scomparsa della membrana nucleare [5].

L'osservazione in microscopia elettronica ha evidenziato la presenza del complesso del Golgi, detto apparato parabasale, e di numerosi ribosomi sia liberi che associati alle membrane del reticolo endoplasmatico. Sono inoltre presenti lisosomi che conferiscono al protozoo attività idrolasica. Nel citoplasma di *T. vaginalis* sono assenti i mitocondri ma si evidenziano numerosi altri organelli caratteristici, gli idrogenosomi, che hanno un diametro circa 0,5  $\mu\text{m}$  e costituiscono circa il 6% del volume cellulare [6, 7].

Gli idrogenosomi per alcuni aspetti sono simili ai mitocondri: sono rivestiti da due membrane addossate l'una all'altra e contengono una matrice granulare ed un core elettrondenso.

Inoltre le proteine citoplasmatiche che devono essere veicolate verso tale organulo possiedono un peptide segnale ammino-terminale, che viene eliminato subito dopo l'ingresso nell'organulo, come avviene nei mitocondri.

A differenza dei mitocondri, tuttavia, gli idrogenosomi mancano di DNA e di citocromi. Il nome idrogenosoma deriva dalla loro capacità di produrre idrogeno molecolare come prodotto metabolico finale [8]. Le reazioni biochimiche che avvengono in questi organuli rappresentano parte integrante del metabolismo energetico di *T. vaginalis* [8].

Recentemente è stato dimostrato che *T. vaginalis* può instaurare una relazione simbiotica con il batterio *Mycoplasma hominis*. Il batterio può avere sia localizzazione extracellulare che intracellulare: ciò dipende da caratteristiche intrinseche del ceppo isolato [9-11]. Tale relazione rappresenta la prima simbiosi descritta tra due patogeni veri, in grado di infettare un ospite immunocompetente, causando patologie indipendenti a carico degli stessi organi.

## Genoma

Recentemente è stato sequenziato il genoma di *T. vaginalis*. La sequenza è stata generata con la metodologia whole-genome shotgun, e contiene 1,4 milioni di reads shotgun assemblate in 17.920 scaffolds per una copertura stimata di 7.2X. Almeno il 65% del genoma di *T. vaginalis* è costituito da sequenze ripetute. Nonostante siano state sviluppate diverse procedure per implementare l'assemblaggio, la sovrabbondanza di repeats ha prodotto una sequenza frammentata, impedendo lo studio dell'architettura del genoma di *T. vaginalis*. Questa caratteristica ha anche reso difficoltosa la determinazione delle dimensioni del genoma stesso, che sono state comunque stimate in circa 160 MB. E' stato identificato un set di base di 60.000 geni codificanti proteine, una delle cifre più alte tra gli eucarioti. Sono stati identificati introni in 65 geni, compresi i 20 in cui erano stati precedentemente dimostrati. Sono stati trovati tRNA per tutti e 20 gli aminoacidi, e sono state inoltre identificate circa 250 unità di DNA ribosomale (rDNA), tutte localizzate su uno dei sei cromosomi di *T. vaginalis*. Durante l'annotazione del genoma sono state trovate 152 possibili casi di trasferimento laterale genico (LGT) da procarioti. Le funzioni putative di questi geni sono diverse, e influenzano diverse vie metaboliche e quindi influenzando l'evoluzione del metaboloma di *T. vaginalis*. La maggior parte (65%) dei geni putativamente derivati da LGT codificano per enzimi metabolici, più di un terzo dei quali sono coinvolti nel metabolismo dei carboidrati e degli aminoacidi. Diversi dei geni acquisiti per LGT potrebbero essere derivati da batteri del genere *Bacteroides*, che sono abbondanti nella flora intestinale dei vertebrati [12].

## Metabolismo

*T. vaginalis* è un eucariote primitivo, per molti aspetti simile ad altre cellule superiori, da cui si differenzia però per quanto riguarda il metabolismo energetico e alcune esigenze nutrizionali che lo avvicinano ad alcuni batteri anaerobi primitivi [13]. Nel protozoo sono infatti assenti alcune vie metaboliche fondamentali, rendendo quindi necessari come nutrienti numerosi metaboliti preformati.

*T. vaginalis* può essere definito ossigeno-tollerante, essendo in grado di sopravvivere a diverse  $pO_2$ . Il protozoo cresce meglio in condizioni anaerobiche, che in vitro sono generate sia dalla presenza di agenti riducenti nel mezzo di coltura, che dal suo metabolismo respiratorio che tende a consumare rapidamente l'ossigeno presente.

La principale fonte di energia di *T. vaginalis* è rappresentata dai carboidrati fra cui il glucosio, maltosio e galattosio; saccarosio e mannosio non sono invece metabolizzati dal protozoo [14]. La più importante fonte endogena di energia è rappresentata dal glicogeno, che costituisce il 20% del peso a secco dell'organismo.

Il metabolismo dei carboidrati è di tipo fermentativo sia in condizioni aerobiche che anaerobiche ed il glucosio viene completamente ossidato. I cataboliti prodotti comprendono acetato, malato, lattato, glicerolo e  $CO_2$ . In condizioni anaerobiche viene prodotto anche idrogeno molecolare [15, 16].

*T. vaginalis* non è in grado di sintetizzare de novo acidi grassi e steroli, in quanto manca degli enzimi necessari. Infatti idrolizza i gruppi acilici da fosfolipidi, colesterolo e trigliceridi per sintetizzare i lipidi ad esso necessari [17].

I carboidrati sono la fonte energetica d'elezione per *T. vaginalis*, ma in assenza di questi è in grado di sostentarsi metabolizzando anche amminoacidi quali arginina, treonina e leucina. [18-21].

L'incapacità di sintetizzare molecole indispensabili per la sopravvivenza fanno di *T. vaginalis* un parassita obbligato che reperisce i nutrimenti dalle secrezioni vaginali o fagocitando le cellule dell'ospite o batteri. Il terreno utilizzato per le colture di *T. vaginalis* è il Diamond's TYM (trypticase-yeast extract-maltose) ricco di triptone, estratto di lievito, ferro a cui si aggiunge siero fetale bovino e vitamina A [22-24].



## **Epidemiologia, manifestazioni cliniche**

*T. vaginalis* è l'agente eziologico della tricomoniasi, una delle malattie a trasmissione sessuale più diffuse al mondo. Si stima che più di 200 milioni di individui siano affetti dalla malattia, di cui 2 milioni negli Stati Uniti, e annualmente vengono registrati 7-8 milioni di nuovi casi [25, 26].

Un recente studio epidemiologico condotto negli Stati Uniti ha rilevato una prevalenza del 3.1% nelle donne di età compresa tra 14 e 49 anni con un valore che arriva nelle donne di colore fino al 13.3% [27].

L'incidenza dell'infezione dipende da numerosi fattori: età, costumi sessuali, numero di partner, altre malattie a trasmissione sessuale concomitanti, fase del ciclo mestruale e tecniche diagnostiche utilizzate [28].

L'uomo è l'unico ospite naturale di *T. vaginalis* e la trasmissione avviene quasi esclusivamente per contatto sessuale, nonostante alcuni studi abbiano avanzato l'ipotesi di una trasmissione non sessuale dell'infezione [29]

Nelle donne *T. vaginalis* infetta principalmente l'epitelio squamoso del tratto genitale. Il quadro clinico può variare da un'infezione asintomatica fino alla vaginite conclamata. I fattori responsabili di tale variabilità non sono completamente conosciuti, ma comprendono sia differenze di virulenza tra diversi ceppi del protozoo che una diversa suscettibilità individuale dell'ospite infettato [30].

La percentuale di infezioni asintomatiche varia dal 9 al 56% dei casi in relazione ai gruppi di popolazione presi in esame [31].

L'infezione sintomatica è caratterizzata nel 50-75% dei casi dalla presenza di secrezioni vaginali anomale che possono essere maleodoranti, abbondanti, schiumose, giallo-verdastre e da irritazione vulvovaginale.

Tra le manifestazioni cliniche sono state riportate dispareunia, disuria e dolori addominali rispettivamente nel 10-50%, nel 30-50% e nel 5-12% dei casi. All'esame ginecologico la vulva presenta un eritema diffuso o escoriazioni in meno del 20% delle pazienti, un'infiammazione della parete vaginale (40-75%), e la cosiddetta cervice a fragola che, pur essendo descritta come segno tipico dell'infezione da *T. vaginalis*, è osservata solo in circa il 2% dei casi [32].

E' stata inoltre osservata una variabilità della sintomatologia nelle diverse fasi del ciclo mestruale. Infatti l'infezione diventa spesso latente durante le fasi follicolare ed ovulatoria del ciclo, mentre si ha generalmente un'esacerbarsi dei sintomi durante la fase mestruale. Ciò probabilmente è legato alle variazioni del pH e del quadro ormonale che si verificano durante le diverse fasi del ciclo, alle quali il protozoo potrebbe essere suscettibile.

In corso di gravidanza le complicanze più comuni dell'infezione da *T. vaginalis* consistono in parto prematuro, rottura precoce delle membrane e basso peso del bambino alla nascita. Tuttavia nessuna di queste manifestazioni cliniche è sufficientemente specifica da consentire una diagnosi precisa [25, 26]. Esiste una notevole sovrapposizione tra il quadro clinico dell'infezione da *T. vaginalis* e quello da *Candida spp.* o da *Gardnerella vaginalis*, per cui è sempre necessaria una diagnosi di laboratorio per la conferma del sospetto clinico.

La metodica più diffusa per la diagnosi di tricomoniassi è l'osservazione microscopica di un vetrino a fresco allestito da fluidi vaginali [33, 34]. Questa metodica già descritta da Donnè nel 1836, permette di evidenziare l'infezione solo nel 60-70% dei casi effettivamente positivi [35]. E' infatti molto importante l'interpretazione data dall'operatore che deve possedere una notevole esperienza nel riconoscere il protozoo anche quando presenta morfologie inconsuete o ha perso la caratteristica motilità. Per questo motivo all'esame microscopico a fresco si dovrebbe affiancare sempre l'esame colturale per la diagnosi di tricomoniassi.

Nonostante siano state messe a punto anche diverse metodiche di PCR [36] [37-39] per la diagnosi, questa non è ancora entrata a far parte della routine di laboratorio.

Nel maschio l'infezione è quasi sempre asintomatica, e si risolve spontaneamente nell'arco di tre settimane, a meno che non intervengano fattori di reinoculo o che il protozoo non infetti anche le vie genitali più alte quali prostata o vescicole seminali. La sintomatologia, se presente, si manifesta con uretriti e prostatiti croniche [40-42].

Le complicanze più comunemente riportate consistono in un'alterata motilità degli spermatozoi e sterilità [43, 44].

E' stato recentemente dimostrato che la tricomoniassi è associata ad un'aumentata suscettibilità all'infezione da HIV. Questa è legata sia all'aumento del numero di virus HIV nelle secrezioni genitali quando siano in corso altre infezioni sessualmente trasmesse, sia

all'incremento della suscettibilità all'infezione virale associato alle microulcerazioni che si accompagnano all'infezione da parte del protozoo [45, 46].

## **T. vaginalis e infiammazione.**

*T. vaginalis* aderisce selettivamente alle cellule dell'epitelio vaginale, ed ha la capacità di sopravvivere per anni nell'ostile ambiente vaginale tipicamente acido, resistendo alla risposta immune e convivendo con un'imponente microflora commensale.

È importante inoltre ricordare che l'infezione da *T. vaginalis*, spesso ricorrente, è responsabile di una risposta immune non duratura per cui la risposta immune innata gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'infezione.

Sono state formulate diverse ipotesi sul meccanismo mediante il quale il protozoo interagisca con il sistema immunitario.

Diversi esperimenti hanno dimostrato che *T. vaginalis* ha la capacità di fagocitare una grande varietà di cellule umane e microrganismi, inclusi eritrociti, leucociti, cellule vaginali epiteliali, batteri, lieviti e particelle virali [47]. La fagocitosi dei leucociti potrebbe essere una delle vie che il parassita ha sviluppato per sfuggire al sistema immunitario, determinando l'assenza di sintomi osservata nella maggior parte delle infezioni. Anche le proteasi degradando citochine e anticorpi [48], concorrono per questo obiettivo; per alcune inoltre è stata dimostrata l'attività antiapoptotica su molti tipi di cellule immunitarie della mucosa [49].

Nonostante siano stati chiariti alcuni dettagli, il meccanismo complesso per ottenere nutrienti, stabilire infezione, muoversi nel tratto uro-genitale, evitare o adattarsi alla risposta immunitaria e propagare l'infezione è ancora poco conosciuto.

In tutti i casi l'equilibrio tra intensità della risposta immunitaria dell'ospite e virulenza del microrganismo si riflette nella durata dell'infezione, nella sintomatologia e nelle complicanze che possono essere associate ad essa [50]. Essendo l'uomo l'unico ospite, per il protozoo l'infezione ottimale risulta quella in cui riesce ad insediarsi nel suo ospite definitivo portando ad una sintomatologia subclinica.

Nell'ospite gli eventi infiammatori in generale, in particolare quelli cronici, sono stati da diverso tempo individuati come fattori tumorigenici, in alcuni casi in un meccanismo di

causa–effetto, tanto che circa il 20% di tutte le forme di cancro sono il risultato di infezioni croniche [51, 52].

Capire la complessa interazione tra *T. vaginalis*, la microflora vaginale e l'ospite potrebbe essere la chiave che permette di chiarire alcuni aspetti ancora poco conosciuti della patologia, per poter studiare strategie vaccinali, terapie e poterne evitare le complicanze.

### ***T. vaginalis* e cancro**

Le forme di cancro con le quali è stata associata l'infezione da *T. vaginalis* sono il cancro intraepiteliale cervicale e il cancro alla prostata.

Diversi gruppi di ricerca hanno studiato la correlazione tra infezione da *T. vaginalis* e neoplasia cervicale e la maggior parte degli studi ha dimostrato un legame tra le due patologie.

Nel 1992 Gram et al. [53] in uno studio finalizzato ad evidenziare una correlazione tra infezione HPV e cancro intraepiteliale alla cervice, dimostrarono una correlazione indipendente con infezione da *T. vaginalis*. Nello stesso anno in un altro report [54] alcuni autori riportano invece l'assenza di correlazione.

Yap et al. [55] effettuarono dei saggi su sieri di donne affette da cancro cervicale invasivo e su controlli (stessa età, nessun carcinoma) trovando anticorpi anti *T. vaginalis* nel 41% delle pazienti con carcinoma e nel 5% dei controlli sani; gli autori ipotizzarono che *T. vaginalis* potesse agire come cofattore, a causa della risposta immune suscitata o come veicolo di infezioni virali.

In una recente pubblicazione [56] sono state osservate delle differenze fenotipiche tra ceppi isolati in donne con neoplasia cervicale ed altri isolati in donne sintomatiche per *T. vaginalis*, ma negative per la neoplasia ipotizzando una correlazione con il cancro e particolari ceppi con maggiori potenzialità proliferative.

Anche il legame epidemiologico e molecolare tra *T. vaginalis* e il carcinoma prostatico non è ancora molto chiaro.

Il protozoo è stato proposto per la prima volta come elemento di interesse per la carcinogenesi alla prostata da Wynder et al. [57]. Altri autori. [58, 59] diedero valore a

questa ipotesi osservando infiltrazioni infiammatorie e foci di iperplasia epiteliale in tessuti prostatici di uomini infetti da *T. vaginalis* nel 1987.

*T. vaginalis* causa uretriti non gonococciche o prostatiti in una bassa percentuale di uomini [60] mentre più frequentemente l'infezione si presenta in forma asintomatica [61]. È stato ipotizzato che queste infiammazioni asintomatiche, e quindi spesso non trattate, possano permettere la persistenza del patogeno nell'uretra maschile con un rischio di ascesa alla ghiandola prostatica più elevato rispetto alle altre malattie sessualmente trasmissibili [62]. Raggiungendo la prostata, in assenza di sintomi, il protozoo potrebbe dar luogo ad un'infezione a lungo termine e cronicizzare. Queste ipotesi sono supportate da osservazioni su campioni di uomini asintomatici, partner di donne affette da tricomoniassi, molti dei quali sono cronicamente infetti [63-67].

Un altro meccanismo potrebbe essere coinvolto con la carcinogenesi: la lisi del tessuto epiteliale prostatico causata da *T. vaginalis* è ripristinata da rigenerazione cellulare che in condizioni di stress infiammatorio, potrebbe essere disregolata [68].

In uno studio [69] viene osservata un'alta prevalenza di infezione da *T. vaginalis* in pazienti affetti da iperplasia prostatica benigna e viene sottolineato come sia stato già dimostrato che l'infiammazione cronica è il fattore inducente verso la progressione della patologia a forme tumorali.

È stato inoltre dimostrato che l'adesione del protozoo alle cellule epiteliali, così come la produzione di proteasi, determini una modificazione della regolazione di geni coinvolti nell'apoptosi, inibendo fattori che possono bloccare la crescita cellulare incontrollata [70].

La coesistenza o il manifestarsi di uno di questi eventi (infiammazione cronica, lisi, inibizione dell'apoptosi), potrebbe potenzialmente indurre lo sviluppo di foci tumorali nell'epitelio prostatico.

Per indagare sulla correlazione tra tricomoniassi e cancro alla prostata sono stati condotti pochi studi sierologici [71-73]. Nel 2010 Sutcliffe in seguito a studi epidemiologici ipotizzò una correlazione con una forma di cancro prostatico particolarmente invasiva [74]. Altri autori invece [75] affermano che non ci sia alcuna correlazione tra l'infezione e lo sviluppo di tumore prostatico. Tuttavia in questo studio, la diagnosi di tricomoniassi è effettuata mediante la ricerca di DNA del patogeno in campioni prostatici fissati di pazienti

affetti da carcinoma prostatico, procedura discutibile se si ricorda che non sempre il protozoo durante l'infezione raggiunge la ghiandola prostatica.

In un recente lavoro [2] hanno ipotizzato il meccanismo molecolare tramite il quale *T. vaginalis* promuove il cancro alla prostata sintetizzando i meccanismi di cui si è parlato in precedenza, in particolare sottolineando il ruolo dell'infiammazione e dell'adesione del protozoo alle cellule bersaglio. Gli autori espongono dei dati preliminari nei quali si mostra come l'adesione del protozoo, tramite adesine, possa attivare un meccanismo a cascata nel quale sono coinvolti proto-oncogeni quali *PIM1*, *c-MYC*, e *HMGA1*, e che potrebbe sfociare nella carcinogenesi della prostata [68].

## Meccanismi di patogenicità

Nonostante *T. vaginalis* sia l'agente responsabile della malattia a trasmissione sessuale non virale più diffusa al mondo, i meccanismi di patogenicità e le caratteristiche di virulenza non sono stati ancora chiariti.

*T. vaginalis* è capace di lisare diversi bersagli cellulari, sia cellule aderenti (cellule epiteliali vaginali) che cellule in sospensione (globuli rossi) che sono i due tipi cellulari solitamente usati per i modelli di patogenicità in vitro. Rispetto ai monostrati di cellule epiteliali vaginali (VECs), l'uso dei globuli rossi ha apportato diversi vantaggi: le lisi è rapida, facilmente osservabile e facilmente quantificabile mediante misurazione spettrofotometrica dell'emoglobina rilasciata; le membrane degli RBCs risultano tra le meglio conosciute e caratterizzate. Inoltre in vivo sono bersagli di lisi (Lehker, Chang et al. 1990) come fonte di nutrienti, lipidi e in particolare ferro.

Le evidenze sperimentali pubblicate, talora contraddittorie, sui meccanismi citopatogenici lasciano questa linea di ricerca, iniziata negli anni '40 [76, 77], ancora priva di alcune spiegazioni riguardo la capacità del protozoo di causare patologia.

Houge [78] per prima ha descritto l'effetto di *T. vaginalis* sulle colture cellulari. Il contatto tra cellule di diversa origine e protozoi vivi comportava una loro "retrazione", osservabile anche quando le cellule erano messe a contatto con supernatanti filtrati del protozoo. Queste prime osservazioni suggerivano che *T. vaginalis* danneggiasse le cellule mediante tossine secrete.

Una teoria successiva [79] supportava invece un'ipotesi secondo la quale il danno cellulare è mediato dall'azione meccanica dei flagelli sulle cellule bersaglio, escludendo che i supernatanti acellulari avessero attività litica [80].

Da altri autori è stato invece proposto che *T. vaginalis* danneggi le cellule dell'ospite sia mediante contatto diretto che attraverso la produzione di fattori secreti [81].

In un altro lavoro [82] si osservò come *T. vaginalis* cambiasse morfologia nel contatto con le cellule epiteliali ipotizzando un'attività di fagocitosi da parte del protozoo. Heath [83] osservò la distruzione del monostrato cellulare dopo contatto con aggregati di protozoi, suggerendo che "il contatto tra protozoi e cellule bersaglio è un fattore importante nella

patogenesi". L'ipotesi fu confermata da Alderete [84, 85] il quale, osservò assenza di lisi in esperimenti con protozoi fissati o surnatanti acellulari.

Lavori successivi hanno cercato di chiarire la citopatogenicità nelle varie fasi: l'adesione cellula-cellula [85-89]; l'interazione con i componenti della matrice extracellulare [90]; la lisi della cellula bersaglio [91-93] e la fagocitosi di questa e di batteri costituenti la flora vaginale [94]; infine la secrezione di fattori solubili. L'adesione di *T. vaginalis* alle cellule bersaglio è un passaggio critico nella patogenesi del parassita [93, 95, 96]: il protozoo si trova a stretto contatto con la cellula dell'ospite creando un microambiente nel quale si raggiungono le condizioni ottimali per l'attività dei diversi effettori di patogenicità.

La modificazione della morfologia del protozoo, durante l'adesione al target cellulare, è una conseguenza del riarrangiamento del citoscheletro, associato ad una ridistribuzione della  $\alpha$ -actinina, normalmente distribuita omogeneamente nel citosol, che viene concentrata nella periferia della cellula [95].

In una recente review [97] si elencano i vari meccanismi proposti responsabili dell'adesione tra *T. vaginalis* e le cellule bersaglio:

I) Un set di proteine metaboliche che pare abbiano proprietà secondarie di adesione.

Al riguardo, sono descritte in letteratura diverse adesine e cisteina proteasi. Secondo gli autori, il contatto iniziale con la cellula ospite determina una modificazione morfologia del protozoo in senso ameboide, con produzione di pseudopodi seguita da un aumento della sintesi delle adesine che è regolata dalla disponibilità di ferro e cisteina proteasi [87, 98]. Sul ruolo svolto da queste proteine è stato spesso dibattuto. Si tratta infatti, eccetto per una delle cinque proposte come adesine, di proteine coinvolte nei principali processi metabolici per le quali è stata osservata una mancata localizzazione sulla membrana, compromettendo pertanto la possibilità di avere un ruolo nell'adesione. [99, 100].

In un altro lavoro [101] anche la GAPDH è stata proposta come proteina di adesione, ma anche questa ipotesi ha suscitato dubbi nella comunità scientifica [97].

II) Glicocongiugati di superficie.

Sulla superficie di *T.vaginalis* sono stati caratterizzati dei lectin-binding carbohydrates [102], la cui presenza sembra essere correlata con la virulenza ed in particolare con la lisi degli



eritrociti [103], con la fagocitosi delle cellule bersaglio [104] e con la suscettibilità ai farmaci [105].

Visto che diverse linee di ricerca suggerivano che dei carboidrati di superficie avessero un ruolo nell'adesione e nella virulenza, diversi ricercatori iniziarono a porre l'attenzione sul glicocalice di *T. vaginalis* isolando il glicoconjugato più abbondante: LPG (lipofosfoglicano) [106, 107]. Di recente è stata chiarita la struttura rinominando la molecola lipoglicano (LG) [108] che è in grado di legare in maniera specifica le cellule dell'ospite [106, 109, 110] attraverso il legame con la galectina-1 nelle cellule epiteliali umane [111].

III) Una serie di proteine di membrana molte delle quali sono state identificate in recenti esperimenti di genomica e proteomica.

Tra le proteine di superficie, la più ampia famiglia identificata è composta da un gruppo di proteine chiamate BspA-like proteins sulla base dell' omologia con proteine di *Tannerella forsythensis* [112] capaci di legare la fibronectina e il fibrinogeno. È noto che questo tipo di legame in *T. vaginalis* determina modificazioni all'interno della cellula coinvolgendo proteine del citoscheletro actina ed  $\alpha$ -actinina, con conseguenti modificazioni della morfologia del protozoo [113, 114]. Tra le BspA-like, la TvBspA-like-625 è stata localizzata attraverso tecniche di microscopia confocale sulla membrana plasmatica del protozoo e sulla base delle caratteristiche di sequenza, è possibile che sia coinvolta nell'interazione con le proteine dell'ospite.

Esperimenti di adesione in vitro hanno permesso di evidenziare che le cellule epiteliali durante l'infezione da *T. vaginalis* perdono la morfologia tipica diventando tondeggianti, con conseguente disgregazione del monostrato cellulare. Quando il protozoo entra in contatto con una cellula target produce enzimi proteolitici, tra cui le spectrinasi, che degradano la spectrina, un componente del citoscheletro della cellula bersaglio, determinando la perdita della caratteristica morfologia cellulare [96, 114]. Non è noto il preciso meccanismo attraverso il quale la spectrinasi penetra nella cellula bersaglio, ma si ipotizza che essa venga rilasciata in vescicole che poi si fondono con la membrana del bersaglio, o che sia direttamente iniettata nella cellula bersaglio. In ogni caso il contatto tra le due cellule è indispensabile per tale processo [95].

## **Il secretoma di *T. vaginalis***

In seguito al contatto con l'ospite tramite l'interazione di cui si è discusso in precedenza, il protozoo rilascia delle molecole capaci di determinare lisi cellulare sulle quali sono stati riportati dati da diversi autori.

Venne isolata e caratterizzata una proteina chiamata *Cell-Detaching Factor* (CDF) presente nel secreto protozoario e capace di intaccare monostrati cellulari in vitro ma preservando la vitalità cellulare. I livelli di CDF furono correlati con la severità della sintomatologia clinica, infatti l'aumento della produzione di CDF determina un esacerbarsi dei sintomi. La produzione di CDF sembra inoltre essere influenzata dalla concentrazione di estrogeni in vagina[115].

Tra le proteine secrete vennero caratterizzate numerose proteinasi di *T. vaginalis* coinvolte in diversi aspetti della patogenicità del protozoo [116-118], quali l'effetto citotossico, la lisi degli eritrociti [91], l'adesione alle cellule epiteliali [119] e l'evasione delle difese immunitarie [120].

Un fattore sul quale diversi autori concordano sia importante nella secrezione è il pH.

Già nel 1990 si osservò che bassi valori di pH potessero costituire fattori importanti per la lisi contatto-dipendente delle cellule epiteliali da parte del protozoo[121]. Fiori et al. [122] dimostrarono come il pH svolga un ruolo chiave sia innescando la secrezione che regolando l'attività dei fattori litici. Si dimostrò infatti, che i secreti di *T. vaginalis* avevano attività litica solo a valori di pH inferiori di 6.5, con un picco di attività a 5.8. Variando il pH dei surnatanti dopo la secrezione, l'attività litica non si osserva oltre valori di 6.5, ed è ripristinata se il pH viene riportato a valori inferiori, dimostrando l'effetto regolatorio del pH sull'attività degli effettori litici. Al contrario, se il protozoo viene incubato in un terreno a pH 7.0, l'attività emolitica dei surnatanti acellulari risulta assente e non è ripristinabile con nessuna variazione di pH successiva, dimostrando l'importanza del pH anche sulla secrezione stessa e non solo sulla regolazione dell'attività litica. Nello stesso lavoro vennero inoltre descritte la dipendenza della lisi delle emazie in vitro da temperatura, concentrazione di ioni calcio. È stato verificato che il fenomeno è fortemente inibito a 20°C e a 4°C, mentre ha un optimum a 37°C. Inoltre è stato osservato che la lisi è calcio-dipendente, infatti in esperimenti condotti in presenza di EDTA, un chelante del calcio, l'emolisi è completamente inibita.

Il meccanismo che può essere formulato per descrivere la lisi cellulare prevede: adesione del protozoo alla cellula bersaglio, secrezione di proteine regolatrici del pH capaci di acidificare il microambiente tra le due cellule, secrezione di proteine effettori di lisi.

Tra le proteine implicate nella lisi è stato dimostrato il coinvolgimento di proteine formanti poro. Si tratta di molecole capaci di inserirsi nel doppio strato fosfolipidico delle cellule bersaglio, formare canali transmembrana che portano le cellule alla morte per lisi colloid-osmotica. L'utilizzo di protettanti osmotici ha consentito di dimostrare che l'attività emolitica di *T. vaginalis* è causata dalla formazione funzionale di pori nella membrana dei RBC di dimensioni comprese tra 1.14 e 1.34 nm [123]. Diversi patogeni, dai batteri ai protisti, usano le proteine formanti poro per lisare le cellule target dell'ospite.

In seguito al sequenziamento del genoma è stato possibile condurre una ricerca di similarità di omologhi di amoebapore, naegleriapore, proteine formanti poro rispettivamente in *Entamoeba histolytica* e *Naegleria fowleri*. Le amoebapore e naegleriapore appartengono alla famiglia conservata delle *saposin-like proteins* (SAPLIP), che possono essere trovate negli organismi filogeneticamente più distanti, dai protozoi ai mammiferi. Queste proteine hanno tutte in comune un motivo di circa 75 aminoacidi (dominio SAPLIP), caratterizzato da un motivo invariante di 6 cisteine e dall'abbondanza di residui idrofobici [124]. Tali ricerche hanno portato all'individuazione, nel genoma di *T. vaginalis*, di 12 *open reading frames* codificanti per dodici putative proteine formanti poro in *T. vaginalis* (TvSaplip 1-12) [12]. Esperimenti di RT-PCR successivi hanno mostrato che tutti i geni TvSaplip tranne TvSaplip9 sono attivi trascrizionalmente (dati non pubblicati).

Il ruolo delle pore forming proteins in *T. vaginalis* è stato dimostrato solo indirettamente ma finora non si è mai avuta evidenza diretta della loro sintesi.

## Scopo del lavoro

Vista l'importanza delle proteine secrete da *T. vaginalis* nella patogenesi della tricomoniassi il progetto sperimentale seguito nella tesi di dottorato è stato finalizzato a una definizione accurata ed esaustiva del secretoma di *T. vaginalis* in condizioni emolitiche e non emolitiche (pH 5.8 e 7.0).

Lo scopo del lavoro è stato il seguente:

- Messa a punto di una metodica di secrezione ottimizzata per l'analisi proteomica
- Messa a punto dell'analisi in spettrometria di massa
- Descrizione sistematica del secreto
- Analisi differenziale delle proteine secrete nei due differenti pH.

## Materiali e metodi

### Preparazione del secreto

Per le analisi è stato utilizzato il ceppo di riferimento *T. vaginalis* G3. I protozoi sono stati coltivati mediante diluizioni giornaliere 1:16 in terreno Diamond's TYM supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%. Le colture sono state mantenute a 37°C. Per la preparazione del secreto le cellule in coltura in fase esponenziale sono state contate, lavate 3 volte in PBS e risospese alla concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule/ml in PBS-Maltosio 15 mM in due diverse condizioni di pH (pH 5.8 e pH 7.0).

Dopo due ore di incubazione a 37° C il surnatante è stato centrifugato per 10' a 1800 rpm e filtrato con filtri in PVDF con pori del diametro di 0,1 µm. Il secreto acellulare è stato addizionato con un cocktail di inibitori di proteasi (SIGMA ALDRICH), e concentrato con dei filtri da centrifuga dal cut-off di 10 kDa (MILLIPORE) a 14000 rpm, 4°C fino al raggiungimento del volume massimo di 500 µl. Successivamente le proteine secrete sono state precipitate con il kit commerciale 2D Clean Up Kit (GE Healthcare).

I campioni sono stati quantificati con kit commerciale EZQ (Molecular Probes).

### Proteomica bidimensionale e GeLC MS/MS

Per le analisi in elettroforesi bidimensionale, le strip in gradiente di pH 3-11 da 18 cm sono state reidratate con 500 µg di proteine, isoelettrofocalizzate fino a 55000 Vh, e dopo alchilazione e riduzione, le proteine sono state separate in SDS-PAGE in gel di acrilamide a concentrazione fissa del 16%. I protocolli seguiti per le varie fasi sono quelli elencati in dettaglio da Addis e collaboratori [125].

Per la GeLC MS/MS, sono state separati 25 µg di proteine in gel di acrilamide in gradiente 4-20%. [126]. Brevemente, l'intera lane di corsa è stata suddivisa in 36 fettine, ognuna delle quali è stata decolorata, ridotta e alchilata e digerita con tripsina. Per entrambi i replicati biologici di ogni campione sono stati eseguiti due replicati tecnici

## Identificazione delle proteine

In seguito alla digestione con tripsina, i peptidi sono stati analizzati in spettrometria di massa con XCT Ultra 6340 equipaggiata con 1200 HPLC system e chip cube (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Gli spettri ottenuti da ogni singola corsa sono stati unificati in un unico file prima di essere caricati sul programma Mascot Daemon (version 2.3.0, Matrix Science) per l'identificazione delle proteine settando i seguenti parametri di ricerca: *"fixed modifications carbamidomethyl (C), variable modifications pyro-Glu (N- term Q) and oxidation (M), peptide tolerance 30 ppm, MS/MS tolerance 0.4 Da, charge states +2, +3, and +4, and enzyme trypsin, and 1 missed cleavage allowed"*.

Sono state prese in esame solo le proteine identificate grazie ad almeno due peptidi unici. Di queste, sono state scartate dall'analisi quelle che erano presenti solo in uno dei due esperimenti.

## Analisi bioinformatiche

Le analisi di Gene Ontology (GO) sono state condotte con il programma Blast2Go.

Per le analisi di localizzazione cellulare sono stati usati programmi disponibili online: SignalP 4.0 [127] e SecretomeP 2.0 [128].

Come riferimento per le proteine esosomiali è stato usato il database Exocarta (<http://exocarta.org/>) (version 3.2) [129, 130] .

Gli allineamenti di sequenze proteiche sono stati eseguiti su Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per i database disponibili su NCBI o in locale con il programma Blast+ (version 2.2.25) [131] per gli altri database.

Le analisi sulla predizione di struttura tridimensionale sono state fatte con il programma disponibile online InterPreTS ([www.russelllab.org](http://www.russelllab.org)) [132, 133].

## Risultati e Discussione

### **Messa a punto di una metodica di secrezione ottimizzata per l'analisi proteomica**

Vista la scarsa letteratura presente sulla proteomica del secreto, il primo obiettivo è stato quello di mettere a punto un protocollo per la purificazione delle proteine secrete dal protozoo ottimizzata per l'analisi proteomica.

Il primo problema che ci si è posti è stato quello di minimizzare la lisi cellulare durante le fasi di secrezione per cui la vitalità cellulare è stata costantemente monitorata mediante osservazione microscopica e sono stati condotti esperimenti solo con una vitalità superiore al 95%.

Nel lavoro scelto come riferimento per il protocollo di secrezione, l'integrità cellulare era stata dimostrata mediante l'ausilio di traccianti radioattivi [134] per cui è stata seguita la stessa procedura sperimentale.

È stato ipotizzato che la secrezione in vivo avvenga nel microambiente generato dal contatto protozoo-cellula bersaglio. Al contrario, nella procedura seguita, le proteine vengono rilasciate nel terreno di coltura e pertanto diluite in esso, tanto da rendere il secreto tal quale inadatto alle indagini proteomiche scelte, pertanto è stato necessario concentrare il secreto con dei filtri da centrifuga.

Il cut-off dei filtri di 10 kDa è stato scelto per trovare un compromesso tra il numero di proteine perse (con un peso molecolare inferiore al cut-off scelto) e il tempo in cui il campione rimaneva esposto alle proteasi endogene, delle quali era nota la secrezione e che avrebbero potuto degradare il campione.

Infatti, usando filtri con un cut-off inferiore (3 kDa) avremmo avuto un campione più completo, ma allungando i tempi di preparazione, con un livello di degradazione superiore.

In un primo momento si è scelto di separare le proteine in elettroforesi bidimensionale. Sono state ottenute mappe bidimensionali per lisato totale di *T. vaginalis* e per il secreto a pH 5.8.

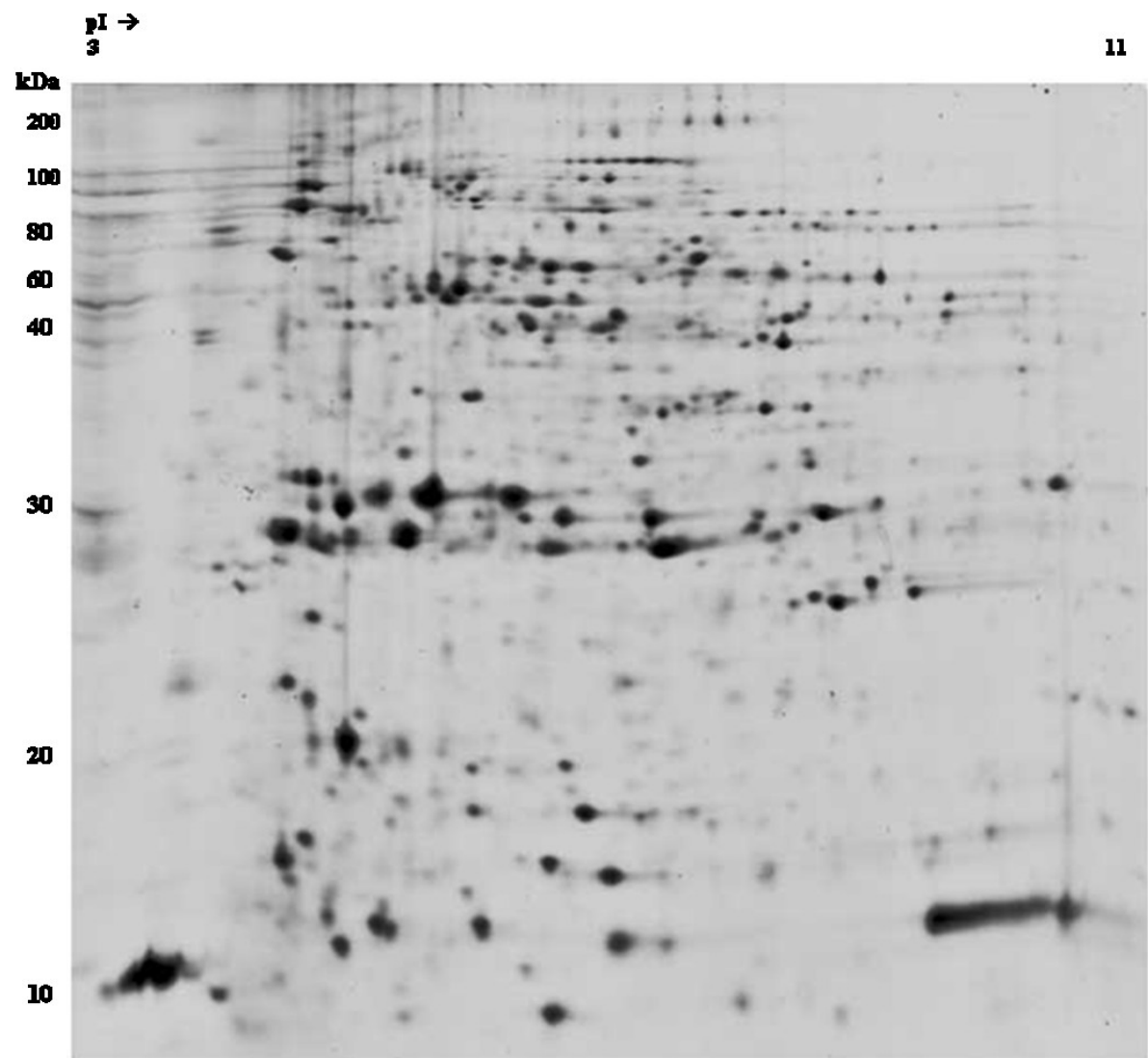
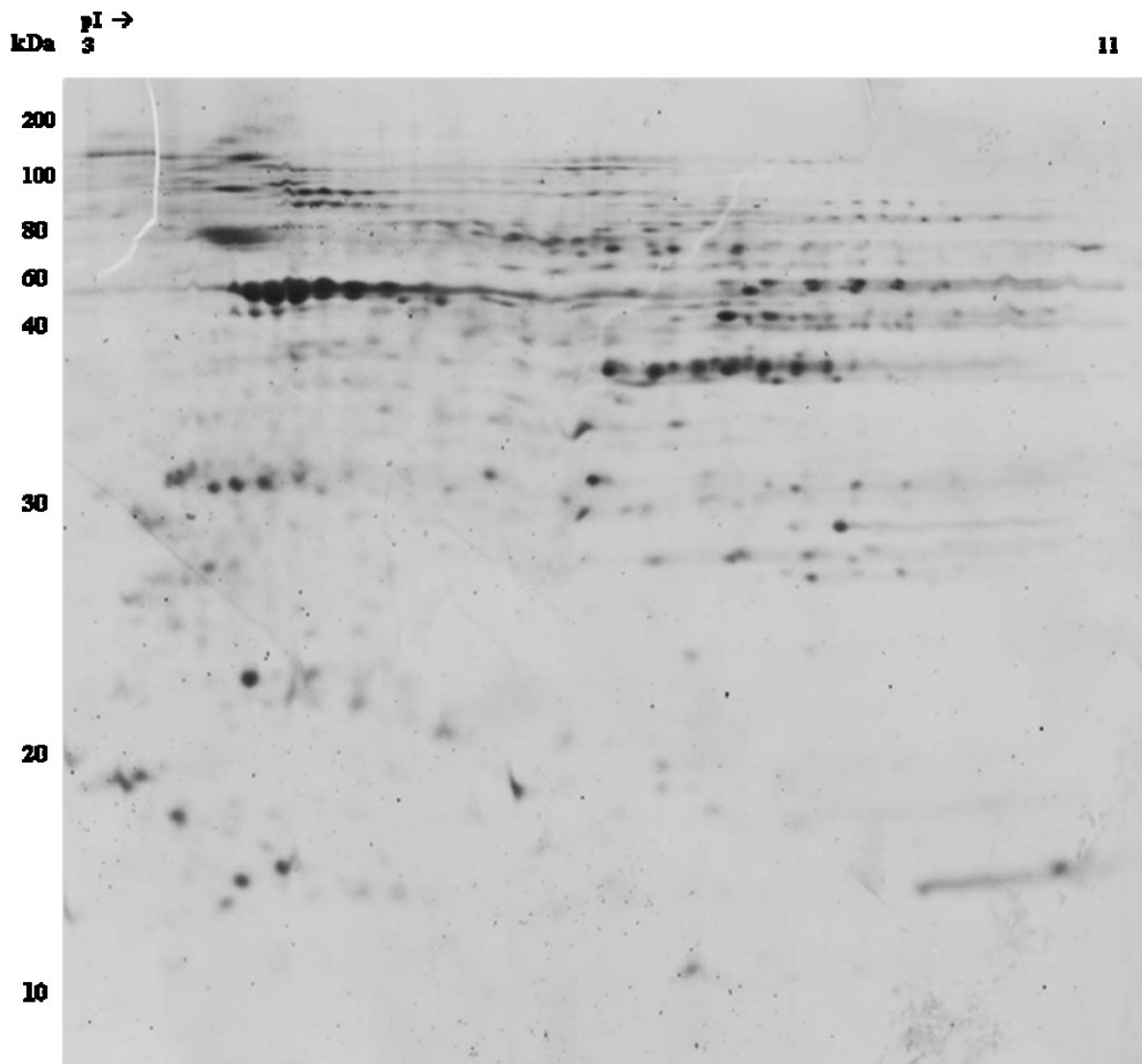


Figura 1. Mappa proteomica bidimensionale del secreto di *T. vaginalis* in PBS-Maltosio 15mM a pH 5.8





**Figura 2. Mappa proteomica bidimensionale delle proteine totali di *T. vaginalis***

Come si può vedere in Figura 1 con la metodica messa a punto si è riusciti ad ottenere una mappa proteomica bidimensionale del secreto di *T. vaginalis*. nella quale gli spot sono ben definiti e risolti, e si può notare uno scarso livello di degradazione. Inoltre il numero di proteine isolate è di gran lunga superiore a quelle osservate nell'unico lavoro di analisi proteomica del secreto di *T. vaginalis* presente in letteratura [135]. Parallelamente, abbiamo ottenuto anche una mappa 2D delle proteine totali di *T. vaginalis*. Ad un confronto, le due mappe appaiono nettamente differenti (vedi Figura 1Figura 2). In caso di un apprezzabile tasso di lisi cellulare, avremmo avuto quanto meno una parziale sovrapponibilità dei due profili elettroforetici. Dal confronto tra la mappa delle proteine secrete a pH 5.8 e quelle

derivanti dal lisato cellulare sono stati scelti alcuni spot proteici da analizzare in spettrometria di massa.

## **Messa a punto del protocollo di analisi in spettrometria di massa ed identificazione**

La prima analisi è stata condotta mediante Maldi-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight). Nonostante gli spettri si presentassero con un basso rumore di fondo e con picchi ben definiti, l'analisi in database non forniva dati statisticamente significativi. Si è ipotizzato a questo punto che, durante le fasi preparative, il campione avesse subito un processo di degradazione dovuto alle proteasi endogene, nonostante le procedure utilizzate per evitarla, come l'uso di inibitori di proteasi, il controllo della temperatura (4°C) e l'utilizzo di un protocollo il più rapido possibile, e che questo avesse portato alla comigrazione in un determinato spot di frammenti originatisi da proteine diverse.

Per questo motivo è stato necessario optare per uno spettrometro di massa più sensibile in cui la cromatografia liquida è accoppiata a tecniche di massa tandem (LC MS/MS).

Utilizzando l'ION TRAP con gli stessi digeriti triptici, sono state identificate 75 diverse proteine, ma vista la complessità del campione si è preferito cambiare metodica proteomica e procedere per tutte le altre analisi con la GeLC MS/MS anziché con la 2D.

In questa tecnica le proteine vengono separate per SDS-page solo in base al loro peso molecolare, e l'intera lane di corsa viene divisa in fettine le quali, in seguito a decolorazione, riduzione e alchilazione, vengono digerite con tripsina. Dall'analisi dei peptidi è possibile ottenere una visione più completa delle proteine presenti rispetto a quella che si ottiene in seguito ad un campionamento di spot nel gel 2D.

In ogni caso anche nella GeLC MS/MS le proteine soggette a digestione da parte di proteasi endogene si presentano come forme peptidiche di vario peso molecolare, che in SDS-page si posizionano ad altezze diverse. Di conseguenza tagliando il gel in fettine, peptidi derivanti dalla stessa proteina si troveranno in fettine differenti. Se si procedesse, quindi, all'identificazione proteica per ciascuna fettina singolarmente si avrebbe una sottostima dei

peptidi appartenenti ad una determinata proteina, che potrebbe portare ad una sua esclusione dalla lista delle identificazioni.

In lavori di proteomica su lisato di *T. vaginalis* [136, 137] la co-migrazione di peptidi è stata osservata portando allo stesso tipo di problematiche di identificazione che hanno causato, nell'impossibilità di usare uno spettrometro a tecnologia massa tandem, una mancata identificazione di proteine con peso molecolare inferiore ai 30 kDa, regione nella quale è statisticamente più probabile trovare una maggiore abbondanza di peptidi per spot.

Diversamente, con il nostro protocollo è stato possibile ottenere identificazioni di proteine fino a 10 kDa (es.TVAG\_272260 9,8 kDa). Per risolvere questo problema, a monte dell'identificazione, è stato fatto un merge degli spettri ottenuti dalle singole fettine.

Per l'identificazione delle proteine, nel programma Mascot è stato integrato un database non ridondante gentilmente fornito dal Dr. Steven Sullivan, con il quale si possono ottenere identificazioni con una nomenclatura omogenea ed univoca, diversamente da altri database quali NCBI o SwissProt solitamente usati in lavori di proteomica.

Ogni proteina identificata (Tabella S 1 e S 2) è riportata in tabella con il rispettivo numero di "*unic spectral counts uSpC*" per ogni replicato: si tratta del numero di peptidi specifici per una proteina (uP) moltiplicati per il numero di volte in cui ogni peptide viene individuato nel campione.

Le proteine sono state incluse nella lista solo se presenti con un numero di uP superiore o uguale a due ed individuate in almeno un replicato tecnico di entrambi i replicati biologici. Gli elevati livelli di stringenza scelti hanno certamente sottratto ai risultati alcune proteine piccole o poco abbondanti presenti nel secreto ma, allo stesso tempo, hanno conferito una significatività maggiore alle proteine che superano la soglia scelta.

Come è possibile osservare nelle tabelle, il numero di proteine identificate con la nostra procedura è piuttosto elevato e decisamente superiore rispetto ad un lavoro presente in letteratura nel quale sono state identificate solamente 19 proteine [138].

## Caratterizzazione del secretoma

Le proteine che abbiamo identificato sono annotate nel database di *T. vaginalis* grazie ai dati ottenuti dal sequenziamento del genoma. In seguito al nostro lavoro si può affermare che queste vengano espresse e secrete dal protozoo.

A molte proteine di queste non è stato associato alcun nome specifico probabilmente perché, in fase di annotazione del genoma, nella sequenza non è stata ritrovata nessuna omologia con sequenze di altri organismi e pertanto sono riportate come "*conserved hypothetical protein*".

Visto che questo gruppo di proteine non annotate rappresenta una parte consistente di tutte le proteine identificate (28% nel secreto a pH 5.8 e 19% nel secreto a pH 7.0), non si deve escludere a priori che esse possano giocare un ruolo importante nei processi di patogenicità mediati da proteine secrete pertanto è importante che siano sottoposte in futuro a lavori di caratterizzazione funzionale.

Per confermare la bontà della metodica usata nel minimizzare la presenza di proteine intracellulari derivanti da lisi cellulare, abbiamo scelto come marcatore di lisi la proteina Arginina deiminasi (TVAG\_467820), di cui è stata dimostrata in precedenza la sicura localizzazione idrogenosomale [21].

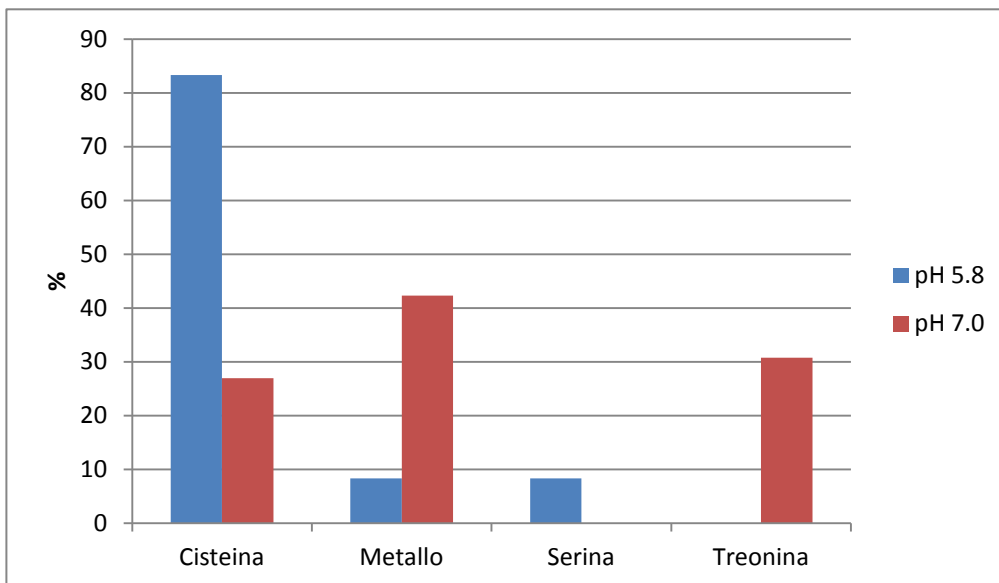
## Le Peptidasi

Dai dati ottenuti si può osservare che le peptidasi rappresentino tra il 10,2 e il 12,3% del totale delle proteine secrete rispettivamente nei campioni a pH 5.8 e 7.0.

Uno studio in silico [100] ha mostrato come nel genoma di Tvag siano presenti oltre 300 ORF predette codificanti per putative peptidasi appartenenti a diversi Clan e Famiglie rappresentando circa lo 0,5% delle proteine predette. Oltre queste è stata osservata anche la presenza di altre 66 sequenze omologhe a quelle di proteasi ma che apparentemente mancano dell'amminoacido catalitico.

Nei nostri campioni sono state identificate proteine appartenenti alle famiglie delle cisteina, treonina e metallo peptidasi ma nessuna appartenente alle aspartico peptidasi.

Come si può osservare nel Grafico 1, nei due pH le peptidasi non sono presenti con la stessa distribuzione.



**Grafico 1.** Nel grafico è mostrata la classificazione delle peptidasi nei due pH in rapporto al totale delle proteasi secrete per ogni condizione.

Nel secreto a pH 5.8 quelle maggiormente rappresentate sono le cisteina proteasi, mentre sono scarsamente o per nulla rappresentate le altre classi.

Nel secreto a pH 7.0 le proteasi più rappresentate sono invece le metallo proteasi e le treonina proteasi, queste ultime presenti esclusivamente in questo campione.

Le treonina peptidasi identificate appartengono al gruppo di peptidasi per le quali non è stato individuato il sito catalitico. La loro effettiva presenza nel secreto potrebbe essere indicatore di un ruolo attivo, forse come modulatore dell'attività peptidasica come ipotizzato da Hirt e collaboratori [139]. È importante osservare che le treonina peptidasi predette dal sequenziamento del genoma sono 8, e sono tutte presenti nel nostro campione.

Come già detto, le peptidasi rivestono un ruolo fondamentale nella biologia di molti protozoi patogeni [140]. Nel caso di *T. vaginalis* le proteasi sono state correlate con la virulenza, ad esempio in fenomeni di adesione, di distacco cellulare, acquisizione di nutrienti, apoptosi delle cellule bersaglio ed emolisi. Si ritiene inoltre che le proteasi prodotte da *T. vaginalis* possano avere un ruolo nell'evasione dalla risposta immune dell'ospite. Difatti è stata osservata un'attività degradativa nei confronti delle immunoglobuline [120].

E' interessante sottolineare come sia stato osservata una variabilità sia a livello qualitativo che quantitativo nell'espressione di alcune cisteina proteasi in diversi isolati clinici di *T. vaginalis* che mostravano un diverso grado di virulenza, misurato come attività citotossica in vitro. Ciò è un'ulteriore conferma dell'importanza rivestita da questa classe di molecole nei processi patogenetici [141].

Considerata quindi la notevole importanza delle proteasi nella biologia di *T. vaginalis*, nonché nelle interazioni con l'ospite, non sorprende che le proteine appartenenti a questa famiglia siano tra le maggiormente rappresentate tra quelle secrete dal protozoo.

## Proteine del trasporto degli elettroni ed omeostasi redox

*T. vaginalis* è un protozoo anaerobio aerotollerante. Durante la colonizzazione del tessuto è sottoposto ad un elevato stress ossidativo generato dall'attacco delle cellule della risposta immunitaria [142, 143], per cui possiede un corredo di proteine finalizzate alla detossificazione delle forme tossiche dell'ossigeno. Anche nelle condizioni sperimentali di secrezione, la coltura è sottoposta a stress ossidativo dato dalla elevata pressione parziale di ossigeno.

Diverse proteine di questa famiglia, che giocano un ruolo importante nella sopravvivenza cellulare durante lo stress ossidativo, sono state ritrovate nei due secreti come ad esempio *iron superoxide dismutase A*, *alkyl hydroperoxide reductase*, *disulfide oxidoreductase*.

Essendo queste proteine le responsabili dell'evasione da un meccanismo di risposta dell'ospite, è prospettabile un loro uso come target molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci contro la tricomoniasi.

## Saposin-like proteins (Saplip)

Come già detto in precedenza, l'insieme delle caratteristiche dell'attività emolitica *in vitro* hanno portato ad ipotizzare un meccanismo citopatico mediato da proteine del tipo delle proteine formanti poro [123].

In occasione del sequenziamento del genoma, sono stati identificati 12 geni codificanti proteine ad alta omologia con proteine formanti poro di *Entamoeba histolytica*, le Amoebapores, denominate Saposin-Like Protein (TvSapliP 1-12)[12]. Esse sono proteine caratterizzate dalla capacità di inserirsi nella membrana delle cellule bersaglio e di formare in essa un poro funzionale permeabile a piccoli ioni determinando una lisi di tipo "colloido-osmotica". Il meccanismo di formazione dei pori da parte di Amoebapore e Naegleriapore è pH dipendente, così come l'attività emolitica di *T. vaginalis*.

È interessante osservare, tra le proteine identificate nel secreto, la presenza di una SapliP annotata come "TVAG\_388060 Saposine, putative" anche annotata come TvSapliP 1.

Il ruolo delle pore forming proteins in *T. vaginalis* è stato finora dimostrato solo indirettamente, attraverso esperimenti che dimostrano la formazione di pori funzionali del

diametro di circa 1,2 nanometri sulle membrane bersaglio. Tuttavia i geni e gli effettori coinvolti nell'effetto citopatico del protozoo non sono stati finora descritti.

L'identificazione nel secreto della SapLip 1 fornisce la prima evidenza sperimentale diretta che una delle pore forming proteins predette sia sintetizzata dal protozoo e secreta

L'identificazione di una sola delle 12 SapLip nel secreto non ci permette tuttavia di concludere che sia l'unica ad essere secreta. Infatti quando il surnatante viene concentrato con filtri da centrifuga (cut-off di 10 kDa), tutte le proteine con peso molecolare inferiore vengono sottratte alle procedure analitiche. Essendo il peso molecolare di alcune delle SapLip al limite del cut off scelto, non si può escludere la secrezione di altre SapLip. La scelta del cut-off di 10 kDa, e non inferiore, è stata effettuata per minimizzare i tempi di preparazione e quindi i fenomeni degradativi altamente probabili in un campione così ricco di proteasi come il surnatante di *T. vaginalis*.

Per completare l'analisi proteomica e chiarire il ruolo di queste proteine si stanno mettendo a punto metodiche di arricchimento su membrana di globulo rosso: l'incubazione di RBC's con surnatante di *T. vaginalis* seguita da analisi proteomica potrebbe permetterci di individuare altre SapliP espresse.



## Analisi differenziale

Osservando le identificazioni ottenute nei due secretomi ottenuti a pH differente, la prima osservazione dovuta è quella che riguarda il numero di proteine identificate: 114 a pH 5.8 e 202 a pH 7.0.

La causa di questa differenza potrebbe essere dovuta a diversi fattori. Poiché molte proteasi hanno un'attività ottimale a pH acido potrebbe esserci stato nel secreto a pH 5.8 un tasso maggiore di degradazione e la formazione di un numero elevato di peptidi durante la secrezione che andrebbero persi nella fase di concentrazione del secreto (fase in cui vengono ritenute molecole con peso superiore ai 10 kDa), determinando una riduzione delle proteine identificate in questo pH. Allo stesso tempo, se ciò fosse vero, si sarebbe dovuto osservare nell'SDS-page un pattern di degradazione, con un intenso bandeggio a bassi pesi molecolari nelle lane del secreto a pH 5.8, evento che invece non si osserva. La differenza in numero di proteine identificate non può essere quindi attribuita solo alla degradazione, anche se il fenomeno non può essere escluso a priori, ma più probabilmente la secrezione è pH specifica.

L'analisi differenziale tra i due campioni risulta piuttosto complessa e in questo lavoro, in base alla metodica proteomica utilizzata di tipo non quantitativo, si possono fare osservazioni solo riguardo proteine presenti in un campione e non nell'altro.

Una prima analisi differenziale si può fare considerando condivise le proteine che siano presenti con lo stesso ID in entrambi i campioni: da questo risulta che 54 su 114 sono esclusivamente presenti nel pH 5.8 e 142 su 202 nel pH 7.0, mentre 60 ID sono in comune.

Tuttavia diverse proteine annotate in database con ID diverso, rimandano allo stesso nome. Dal sequenziamento del genoma è stato rilevato infatti come esistano più copie geniche per la sintesi di proteine con la stessa funzione [12].

In un primo step sono state eliminate dall'elenco le proteine annotate come "*conserved hypothetical protein*" perché su queste non è possibile fare nessuna elaborazione in base al nome; tra quelle rimanenti sono state considerate condivise le proteine nei due elenchi annotate con lo stesso nome: il numero di proteine presenti esclusivamente nel secreto a pH 5.8 scende a 34 mentre nel secreto a pH 7.0 diventa 83 come riassunto in Tabella 1.

Criterio di Esclusività	N° di proteine presenti solo nel secreto a pH 5.8	N° di proteine presenti solo nel secreto a pH 7.0
Diverso ID	54	142
Diverso nome	34	83

Tabella 1: Numero di proteine presenti esclusivamente in un campione in base a due diversi criteri di selezione

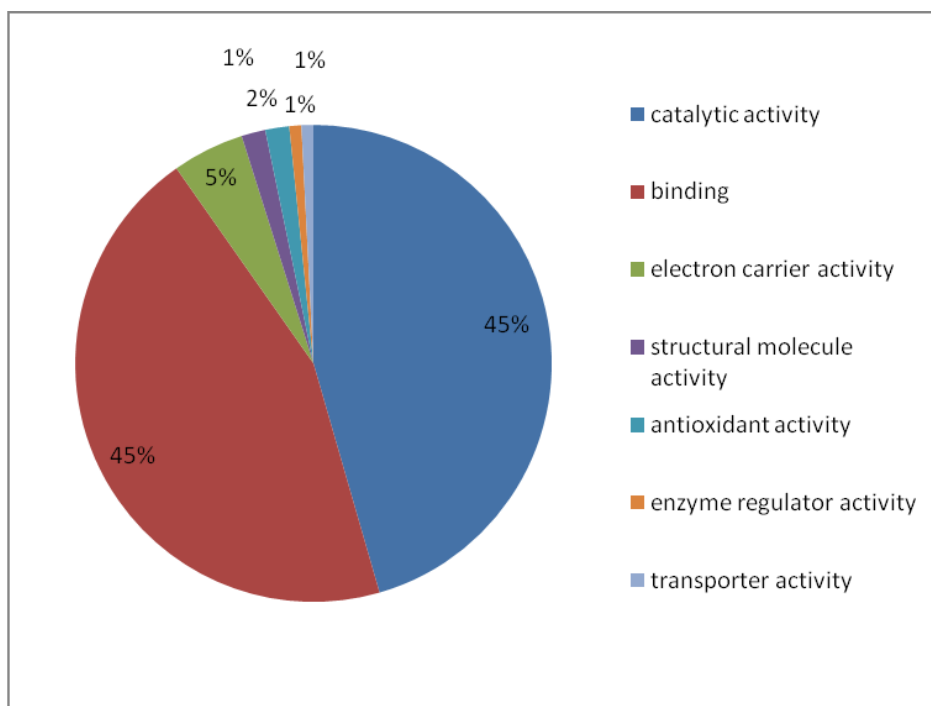
Da questi dati si può concludere che i secreti nelle due condizioni siano profondamente differenti. Si può ipotizzare che, quando il protozoo si trova in condizioni ottimali esprima e secerna un corredo di proteine ben specifico, magari in qualche modo coinvolto con la patogenesi. Resta da chiarire quale ruolo giochi ognuna delle proteine differenzialmente espresse in tale evento.

Sarebbe inoltre auspicabile l'utilizzo di tecnologie proteomiche più avanzate che permettano un'analisi quantitativa delle proteine secrete. Il fenomeno patogenico potrebbe infatti essere finemente regolato da delle proteine per le quali la secrezione è aumentata o ridotta in base alle condizioni ambientali.

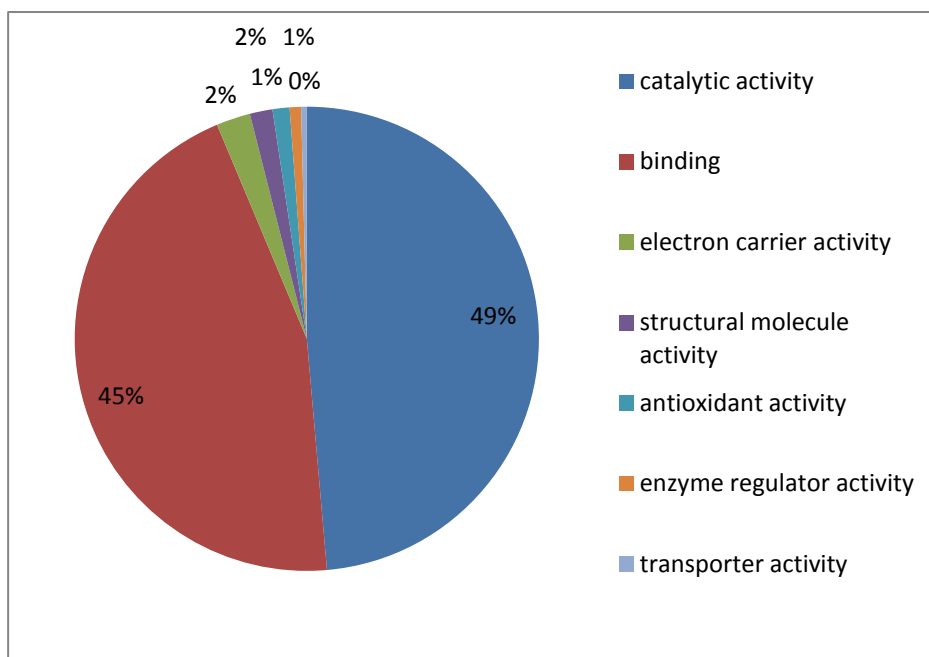
### **Gene Ontology: funzione**

Le sequenze delle proteine identificate nei due pH sono state analizzate con un programma di Gene Ontology: Blast2go. Il 90% delle proteine sottoposte a quest'analisi presenta una o più annotazioni mentre alla classificazione sono sottratte circa il 10% delle proteine in entrambi i secreti, perché ad esse non è stata assegnata nessuna Gene Ontology.

I risultati ottenuti sono rappresentati nei grafici che seguono.



**Figura 3. Gene Ontology per funzione del secreto a pH 5.8 LIVELLO 2**

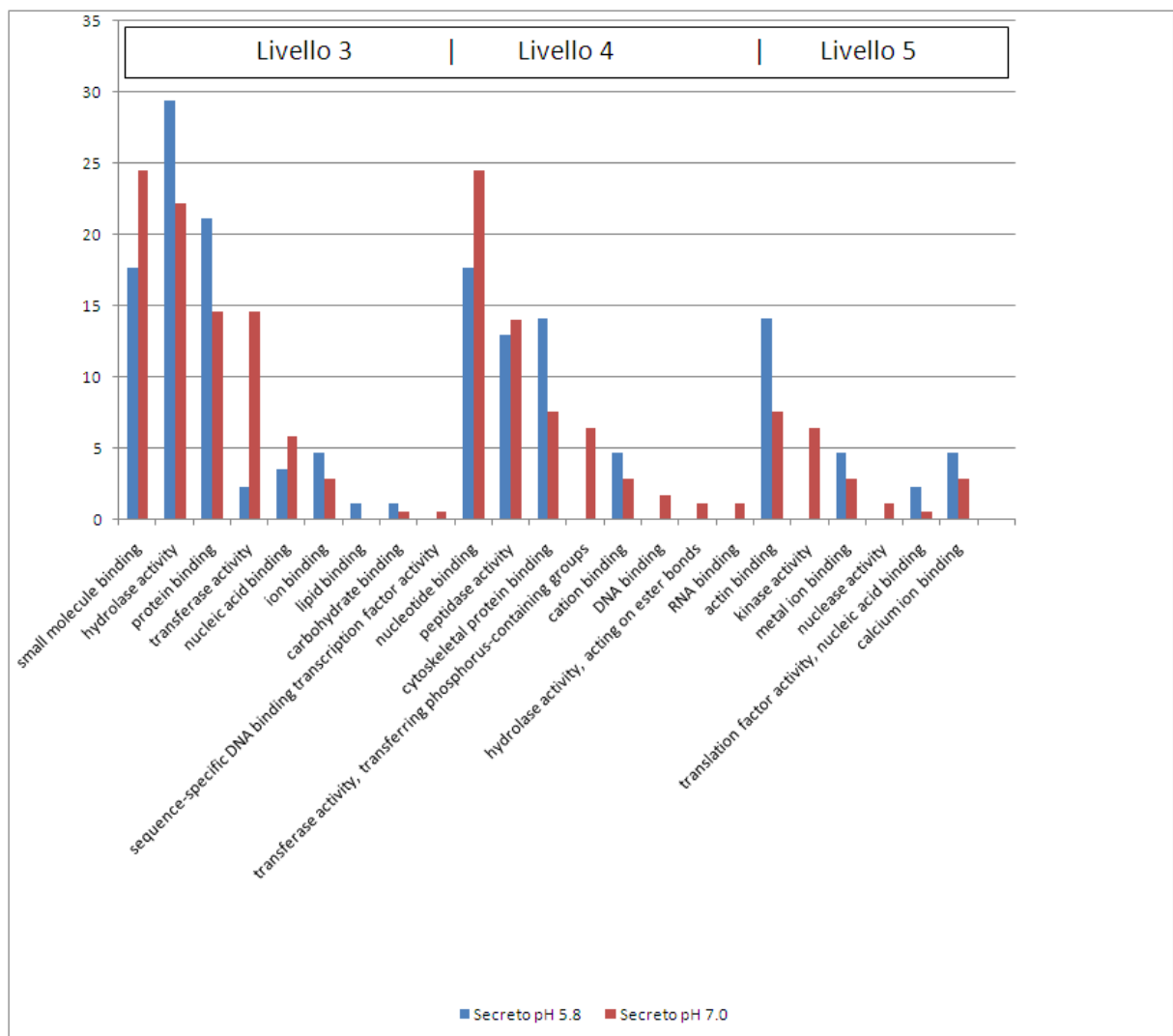


**Figura 4. Gene Ontology per funzione del secreto a pH 7.0 LIVELLO 2**

Nonostante le differenze riscontrate analizzando nel dettaglio le proteine ai due pH, l'analisi dei dati di Gene Ontology per quanto riguarda le funzioni evidenzia come non ci siano grandi

differenze nella classificazione (LIVELLO 2) assegnata nei due pH. In entrambe le condizioni la categoria più rappresentate sono “*catalytic activity*” e “*binding*” anche se si può osservare come sia presente un ampio range di altre funzioni.

Questo tipo di classificazione tuttavia risulta probabilmente troppo poco specifico perché all’interno di ogni classe sono presenti proteine piuttosto eterogenee; osservando le sottoclassi (Figura 5) si possono infatti osservare maggiori variazioni.



**Figura 5: Gene Ontology funzione delle proteine del secreto a pH 5.8 e 7.0**

Le classi nelle quali è più evidente una variazione sono: “*transferase activity*” (livello 3), alla quale appartengono “*transferase activity, transferring phosphorus-containing groups*” (livello 4), e nel livello inferiore “*kinase activity*” (livello 5) iperespresse nel pH 7.0.

In svariati sistemi sperimentali, quali basati su eucarioti superiori o altri microrganismi, le analisi di Gene Ontology danno dei risultati dettagliati ed altamente informativi grazie alla disponibilità di un ricco database di annotazioni. Nel nostro caso, questo tipo di analisi fornisce una caratterizzazione generale del secretoma ma incompleta.

Per il miglioramento di questo tipo di analisi sarebbe auspicabile un riordino e un'annotazione puntuale delle proteine caratterizzate funzionalmente mentre, ad oggi, è facile osservare, nei database più utilizzati, la ridondanza di annotazioni per la stessa sequenza con informazioni o nomi discordanti, evento che rende le analisi di caratterizzazione proteomica di difficile comprensione.

## Localizzazione

Abbiamo analizzato le sequenze identificate nel secreto con diversi strumenti bioinformatici per vedere quale fosse la percentuale di proteine identificate alle quali, con vari parametri, è attribuita localizzazione extracellulare.

Come riferimento sono state usate due delle proteine descritte anche da altri lavori come secrete: diverse sequenze dell'enzima malico (TVAG\_00940 TVAG\_491670 TVAG\_228520 TVAG\_228830 TVAG\_491670) e una cisteina proteasi (TVAG\_298080) [144]

Al programma Blast2go è stata richiesta una caratterizzazione delle proteine in base alla localizzazione putativa per Gene Ontology. Il programma riesce a attribuire una localizzazione solo a circa il 10% delle proteine e di queste solo una è annotata come secreta, riportando la nostra attenzione sul problema dell'aggiornamento dei database sulle sequenze relative a *T. vaginalis* di cui si è discusso in precedenza per la Gene Ontology.

Analizzando le sequenze con il programma SignalP (versione 4.0) che ricerca peptidi segnale nelle sequenze, si osserva un risultato analogo: in particolare solo in 4 su 114 e 5 su 202, rispettivamente ai pH 5.8 e 7.0, viene predetta la presenza di un peptide segnale senza peraltro identificare tra queste le stesse proteine già citate in letteratura. Essendo *T. vaginalis* un eucariote unicellulare separatosi ancestralmente nell'albero filogenetico, esiste la possibilità che esso utilizzi delle sequenze segnale differenti da quelle degli eucarioti superiori dei batteri che sono quelle solitamente utilizzate dai programmi di predizione di localizzazione. È tuttavia possibile che *T. vaginalis* utilizzi delle vie di secrezione non classica, ipotesi tra l'altro già formulata in occasione di altre analisi [145].

Per vagliare questa ipotesi, le proteine sono state analizzate anche con SecretomeP, un programma che predice proteine secrete tramite una via non-classica, integrando i risultati di diversi server. Nonostante il programma sia disegnato per mammiferi o batteri, quindi con sequenze non ottimizzate per *T. vaginalis*, l'analisi dei dati ha fornito risultati più interessanti (Tabella S 5 e Tabella S 6) includendo tra le proteine secrete il 42% e 35,6% del totale, escludendo anche in questo caso le nostre proteine di riferimento (enzima malico e cisteina proteasi). In Tabella S 3 e

Tabella S 1 Tabella S 4 è indicato uno SecretomeP score, il cui valore soglia minimo per proteine con secrezione alternativa è 0,5. Il numero elevato di proteine che superavano

questo score, e alcuni dati in letteratura su *Leishmania donovani* [146], hanno indirizzato le nostre analisi sull'ipotesi che la secrezione fosse mediata da vescicole esosomiali.

A questo punto le proteine sono state allineate con un database disponibile online: Exocarta, un compendio di oltre 13000 proteine individuate in esosomi di diversi tipi cellulari di vari organismi. L'allineamento ha mostrato che il 62% e il 70,8% nei due pH sono proteine che, con un E-value richiesto inferiore a  $10^{-7}$ , hanno omologia con proteine già ritrovate in esosomi. Tra queste sono elencate anche le proteine che avevamo scelto come riferimento.

Nel sito di riferimento per gli esosomi sono elencate anche delle proteine considerabili come marker esosomiali: 9 su 25, sono presenti nel secreto di *T. vaginalis*.

Risulta quindi importante osservare come la scelta del sistema bioinformatico sia determinante nell'elaborazione dei dati visto che le quattro metodiche utilizzate riportano dei risultati considerevolmente differenti. Nel nostro caso la situazione risulta ancor più complicata dall'assenza di programmi dedicati all'analisi di sequenze protozoarie.

A conferma dell'ipotesi sulla produzione di esosomi, alcune immagini di microscopia elettronica mostrano la presenza di piccole vescicole sulla superficie del microrganismo.



**Figura 6: immagine di microscopia elettronica che mostra *T. vaginalis* in contatto con eritrociti. Le frecce indicano alcune microvescicole.**

Il meccanismo di secrezione mediato da microvescicole per il rilascio di effettori di virulenza quali lipidi, proteine e carboidrati è stato dimostrato in molti microrganismi quali *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* [147-149]. Nel caso di *T. vaginalis* è

ipotizzabile che il rilascio di queste microvescicole, nel microambiente generato durante l'adesione del parassita all'ospite, sia stato sviluppato per facilitare il trasporto dei fattori di virulenza evitandone la diffusione e degradazione nel milieu extracellulare.

Inoltre recenti lavori suggeriscono che le microvescicole possano agire come "antigene esca" in vivo, causando la una risposta immunitaria inefficace contro l'organismo intatto ed aumentando la persistenza dell'infezione [150].

Il risultato ottenuto è un forte suggerimento del fatto che *T. vaginalis* produca esosomi e che la maggior parte delle proteine identificate nel secretoma siano secrete mediante questo meccanismo e ci porta anche ad ipotizzare che le microvescicole siano parte attiva nella complessa relazione ospite parassita.



## **Macrophage migration inhibitory factor (MIF)**

Tra le proteine identificate ha attirato la nostra attenzione la presenza, nei secreti ai due pH, di una proteina annotata come “*Macrophage migration Inhibitory Factor*” (MIF), proteina che nell'uomo gioca un ruolo centrale nell'immunità sia innata che adattativa.

MIF è una delle prime citochine descritte e, al contrario di quanto si pensava inizialmente, non solo le cellule T la producano, ma è stato dimostrato che la citochina è rilasciata anche da numerosi tipi cellulari in seguito alla loro attivazione: altre cellule immunitarie, cellule epiteliali e endoteliali, differenti tipi di cellule parenchimali e cellule cancerose.

MIF sostiene l'infiammazione ed è localizzato a monte di *Tumor Necrosis Factor* (TNF), interleuchina (IL 1b), interferon (IFN), e di altre citochine effettrici. In seguito a stimolo è rilasciata rapidamente poiché è conservata preformata nel citoplasma.

Il meccanismo molecolare sottostante l'azione di MIF è stato caratterizzato meglio dopo la scoperta dei recettori cellulari di superficie: CD74. Questo recettore è ampiamente espresso su differenti tipi cellulari, tra cui monociti/macrofagi, cellule B, fibroblasti e endoteliali, cellule epiteliali e stromali. Dopo il legame, MIF attiva la via ERK1/2 delle MAP chinasi innescando una cascata che induce la proliferazione cellulare ed inibisce l'apoptosi.

Al di là del ruolo funzionale, l'attività mediata da MIF è stata correlata con diverse forme tumorali e con un innalzamento del grado di invasività del tumore stesso. MIF è infatti implicata in numerosi processi che contribuiscono a creare un ambiente ricco di condizioni predisponenti la tumorigenesi. Come riassunto da Conroy e colleghi nella Figura 7, MIF è implicata in diversi eventi direttamente coinvolti con il cancro: inibisce p53, sostiene la via ERK, attiva la via COX-2/PGE-2, promuove l'angiogenesi. Inoltre il suo ruolo da mediatore dell'infiammazione, in una posizione di controllo rispetto alle altre citochine potrebbe in via indiretta legarla a questi eventi [151].

MIF functional activities	Role in tumourigenesis
P53 inhibition	Accumulation of mutation Inhibition of apoptosis Proliferation of cells
Sustained ERK activation	Promotes invasion Inhibits cell death
COX-2/PGE-2 induction	Tumour Growth Viability Metastasis
Endothelial cell proliferation and differentiation	Promotes angiogenesis

**Figura 7: Immagine tratta da Conroy e collaboratori. [151]**

Di recente è stato sottolineato il ruolo rivestito da MIF anche nella cancerogenesi prostatica. È osservato un livello di MIF nel siero di pazienti affetti da cancro prostatico più elevato rispetto a pazienti con iperplasia prostatica benigna o a pazienti sani. Nello stesso lavoro è stato proposto lo sviluppo di metodi diagnostici basati appunto sui livelli di MIF ematici [152].

È stato dimostrato che due polimorfismi nel promotore di MIF, associati con una aumento della produzione di MIF, sono anche correlati sia con l'incidenza del tumore sia con la possibilità di ricorrenza entro 5 anni [153]. L'inibizione dell'attività di MIF o del suo recettore attenua invece la crescita e l'invasività di un linea di cellule prostatiche cancerose in vitro [154].

Visto il ruolo che la proteina umana riveste nei processi infiammatori legati all'immunità [155] e visto il suo coinvolgimento in eventi di carcinogenesi in diversi distretti [151], in particolare in prostata, ci è sembrato opportuno approfondire l'analisi sull'ortologo (TVAG\_219170) di *T. vaginalis* identificato nel secreto.

Innanzitutto è stata condotto un'analisi di sequenza per verificare quale fosse la percentuale di omologia con la sequenza umana osservando una identità del 38% e una similarità del 49,5%. L'omologia potrebbe apparire di poco conto se non si avessero evidenze sperimentali che mostrano come in altri sistemi [156], un ortologo al MIF umano con omologia inferiore a quella da noi osservata abbia attività biologica simile a quella umana.

TvMIF	M <b>E</b> ALVIKTN---AKFTEEEKSKATEELGNIVSKVLG <b>K</b> PISYVMVTLEDGVAVRFGGSDEK 57
hMIF	MP ++ TN A + S+ T++L ++ GKP Y+ V + + FGGS E 56
	M <b>E</b> MFIVNTNVPRASVPDGFSLSEL <b>T</b> QQL---AQATG <b>K</b> PPQYIAVHVVPDQLMAFGGSSEP
TvMIF	AAFM <b>S</b> LM <b>S</b> <b>T</b> GGLNRAVNKRASAALTKWFTDH-GFQGDRI <b>V</b> IVFNPKSAEDWGFGDTFA 115
hMIF	A SL SIG + A N+ S L + DR+YI + +A + G+N TFA 115
	CALCSLHS <b>T</b> GKIGGAQNRYSKLLCGLLAERLRISPDRV <b>V</b> INYYDMNAANVGWNNSTFA

**Figura 8: Allineamento tra le sequenze amminoacidiche di MIF in *T. vaginalis* e *Homo sapiens***

È importante osservare che nella sequenza rimangono conservati tutti gli amminoacidi che in letteratura sono considerati fondamentali per l'attività biologica, (evidenziati in rosso nella Figura 8) sia per l'attività pro infiammatoria (Pro-1, Lys-32, Ile-64, Tyr-95) che per l'attività tautomerastica (Pro-1) [157].

Sulle sequenze è stata condotta inoltre un' analisi di predizione della struttura terziaria per verificare il livello di omologia tridimensionale delle due proteine (umana e di *T. vaginalis*); il programma confronta le sequenze riportando uno Z-score. Come si può vedere nella Figura 9, nel nostro caso è calcolato un alto valore di Z= 2.489 indice di un elevato livello di omologia delle strutture.

Z-score ≥ 3.00 2.33 1.65 0.00 -∞

sp|P14174|MIF\_HUMAN with tr|A2DXT4|A2DXT4\_TRIVA

Z-score: **2.489** (raw = 14.270,  $\mu$  = -2.500,  $\sigma$  = 6.738) [Jmol](#)  
 Template: [3hof](#) STRUCTURE OF MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR (MIF) W2 ACID AT 1.9A RESOLUTION  
 Alignment 1: [Query1/1-115 on A/1-114](#) (BLAST E = 5.0e-65, 100.0% id)  
 Alignment 2: [Query2/1-115 on B/1-114](#) (BLAST E = 7.0e-09, 31.9% id)

Z-score: **2.471** (raw = 14.110,  $\mu$  = -2.434,  $\sigma$  = 6.694) [Jmol](#)  
 Template: [3hof](#) STRUCTURE OF MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR (MIF) W2 ACID AT 1.9A RESOLUTION  
 Alignment 1: [Query1/1-115 on A/1-114](#) (BLAST E = 5.0e-65, 100.0% id)  
 Alignment 2: [Query2/1-115 on C/1-114](#) (BLAST E = 7.0e-09, 31.9% id)

**Figura 9: Analisi di predizione di struttura terziaria**

Diversi dati in letteratura riassunti in una review del 2008 riguardante proteine ortologhe a quella umana presenti in nematodi, hanno dimostrato come queste proteine ricombinanti abbiano attività biologica in vitro come chemoattrattante [158] e quindi come mediatore della risposta immune.

Se proteine con un livello di omologia con MIF umana inferiore a quello osservato nel caso, di *T. vaginalis* in organismi filogenicamente più lontani all'uomo rispetto a *T. vaginalis*, hanno attività biologica, è possibile pensare che anche TvMIF abbia un ruolo attivo durante l'infezione da *T. vaginalis* come modulatore di infiammazione e/o come fattore centrale nella carcinogenesi prostatica?

Rispondere a questa domanda è importantissimo sotto tutti gli aspetti della biologia del parassita, per gli studi di patogenicità, ma ancor di più per l'individuazione di bersagli diagnostici o terapeutici per il cancro alla prostata.

Essendo MIF un mediatore dell'infiammazione non specifico per la prostata, non è improbabile che lo stesso sistema molecolare che prevede il coinvolgimento di MIF nel cancro alla prostata sia correlabile anche con l'associazione clinica osservata tra tricomoniassi e tumore della cervice uterina.

## Conclusioni

Il meccanismo mediante il quale *T. vaginalis* è capace di causare patogenicità, nonostante l'importanza sanitaria, sociale ed economica della tricomoniasi, non è stato ancora chiarito completamente. Le proteine secrete dal protozoo, il coinvolgimento delle quali è stato dimostrato da diverso tempo, non sono state ancora descritte nel dettaglio ma sono presenti in letteratura solo studi frammentati ed incompleti.

Con il nostro lavoro si rende disponibile alla comunità scientifica, il primo database proteico dettagliato sul secretoma in condizioni emolitiche e non emolitiche, fonte indispensabile per ulteriori approfondimenti. Grazie al nostro lavoro, è possibile dare conferma della produzione (e secrezione) di proteine annotate nei database come "putative".

Per condurre questa analisi è stato messo a punto un protocollo ottimizzato per l'analisi proteomica approfondita di un surnatante a bassa concentrazione proteica e ricco di peptidasi, applicabile anche in altri modelli biologici.

Nel secretoma sono state inoltre identificate un numero elevato di proteine annotate in database come "*conserved hypothetical protein*" sulle quali è importante approfondire l'indagine in quanto rappresentano delle proteine divergenti/specifiche di *T. vaginalis* e quindi, se ancora conservate dall'evoluzione, di potenziale importanza per la biologia del protozoo patogeno. L'aggiornamento del database fornisce alla comunità scientifica uno strumento fondamentale per tutti i tipi di ricerca sia di base sia finalizzata allo sviluppo di nuove metodologie diagnostiche, terapie o strategie vaginali.

È stato dimostrato, con l'uso di varie analisi bioinformatiche, che il meccanismo di secrezione di *T. vaginalis* sia mediato da esosomi, i quali potrebbero essere coinvolti anche in altri aspetti della comunicazione cellula-cellula e nell'evasione della risposta immunitaria dell'ospite.

Le analisi hanno condotto inoltre alla caratterizzazione completa del degradoma di *T. vaginalis* osservando delle interessanti differenze riguardo le peptidasi coinvolte nelle diverse condizioni di pH analizzate.

È stato possibile dare conferma della produzione di proteine coinvolte nella lisi colloid-osmotica appartenenti alla famiglia delle SapliP, delle quali non si aveva mai avuto evidenza diretta.

È stato ipotizzato un meccanismo molecolare complesso riguardante il legame tra infezione da *T vaginalis*, infiammazione e cancro alla prostata mediato dal coinvolgimento di un ortologo del *Macrophage migration Inhibitory Factor* umano (MIF) secreto da *T. vaginalis*. Le ipotesi formulate, se verificate, potrebbero chiarire alcuni dettagli della complessa interazione ospite parassita. Lo stesso studio riportato all'epitelio vaginale potrebbe portare ad interessanti conclusioni anche sulla correlazione con il carcinoma cervicale.

## Materiali supplementari

**Tabella S 1: Elenco delle proteine identificate nel secreto a pH 5.8 SpC: Spectral Counts**

Protein ID	Protein Name	uSpC	uSpC	uSpC	uSpC
		I a	I b	II a	II b
TVAG_486140	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit, putative	2	1	0	2
TVAG_014160	60S ribosomal protein L12, putative	2	2	2	0
TVAG_192620	actin depolymerizing factor, putative	11	5	4	16
TVAG_054030	actin, putative	20	1	3	5
TVAG_044240	adaptin, alpha/gamma/epsilon, putative	2	0	0	2
TVAG_405240	adenosylhomocysteinase, putative	167	129	180	144
TVAG_210320	adenosylhomocysteinase, putative	176	134	188	164
TVAG_407250	adenylyl cyclase-associated protein, putative	7	3	3	2
TVAG_327470	alcohol dehydrogenase, putative	2	4	11	9
TVAG_228780	alcohol dehydrogenase, putative	3	0	1	8
TVAG_245190	aldo-keto reductase, putative	21	22	18	13
TVAG_205920	alpha-amylase, putative	19	12	0	2

TVAG_347440	annexin VII, putative	5	4	0	4
TVAG_436700	beta-amylase, putative	7	14	1	2
TVAG_010780	beta-hexosaminidase B, putative	4	2	1	3
TVAG_026740	branched-chain amino acid aminotransferase, putative	3	8	3	4
TVAG_235410	breast cancer suppressor candidate 1,bcsc-1, putative	8	7	0	7
TVAG_473170	calcium binding protein, putative	5	1	0	4
TVAG_118780	calmodulin, putative	11	13	1	7
TVAG_254350	calponin/transgelin, putative	3	0	1	3
TVAG_467970	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	120	107	53	93
TVAG_410260	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	2	1	1	2
TVAG_298080	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	68	57	9	23
TVAG_202090	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	68	75	15	23
TVAG_146680	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	0	2	0	5
TVAG_090100	Clan CA, family C1, papain-like cysteine peptidase	99	57	21	42
TVAG_057000	Clan CA, family C1, papain-like cysteine peptidase	131	123	54	50
TVAG_209010	Clan CA, family C40, NlpC/P60 superfamily cysteine peptidase	3	2	3	0
TVAG_426660	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase	91	93	52	49
TVAG_385340	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase	32	47	19	32



TVAG_272260	Clan IH, family I25, phytocystatin-like peptidase inhibitor	4	4	0	5
TVAG_386080	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	2	0	2	14
TVAG_432040	Clan SC, family S28, unassigned serine peptidase	8	3	2	2
TVAG_573910	conserved hypothetical protein	35	33	19	46
TVAG_529190	conserved hypothetical protein	106	119	24	41
TVAG_487100	conserved hypothetical protein	11	16	13	10
TVAG_425470	conserved hypothetical protein	55	44	5	19
TVAG_373190	conserved hypothetical protein	10	9	2	13
TVAG_371800	conserved hypothetical protein	28	21	12	12
TVAG_321740	conserved hypothetical protein	45	60	22	45
TVAG_293660	conserved hypothetical protein	47	47	3	10
TVAG_268070	conserved hypothetical protein	27	27	4	2
TVAG_261950	conserved hypothetical protein	4	6	10	25
TVAG_248050	conserved hypothetical protein	3	3	1	3
TVAG_245580	conserved hypothetical protein	75	66	4	18
TVAG_230400	conserved hypothetical protein	7	6	2	1
TVAG_215920	conserved hypothetical protein	15	7	1	4
TVAG_208990	conserved hypothetical protein	10	8	9	11

TVAG_177320	conserved hypothetical protein	16	26	1	6
TVAG_150280	conserved hypothetical protein	5	10	6	5
TVAG_150220	conserved hypothetical protein	35	28	4	9
TVAG_100720	conserved hypothetical protein	4	4	2	7
TVAG_059980	conserved hypothetical protein	26	29	3	15
TVAG_010770	conserved hypothetical protein	5	6	3	2
TVAG_453300	conserved hypothetical protein	5	3	0	2
TVAG_410350	conserved hypothetical protein	5	6	5	0
TVAG_383310	conserved hypothetical protein	15	8	0	2
TVAG_369130	conserved hypothetical protein	5	3	0	2
TVAG_351790	conserved hypothetical protein	6	10	2	0
TVAG_277870	conserved hypothetical protein	8	3	0	2
TVAG_152520	conserved hypothetical protein	13	11	0	3
TVAG_088640	conserved hypothetical protein	31	21	0	12
TVAG_328570	conserved hypothetical protein	2	0	0	3
TVAG_242510	conserved hypothetical protein	2	0	0	2
TVAG_181560	conserved hypothetical protein	2	0	0	4
TVAG_484050	conserved hypothetical protein	0	3	5	0

TVAG_135190	cytidine deaminase, putative	9	4	2	2
TVAG_379830	deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase, putative	1	2	0	5
TVAG_474980	dihydrolipoamide dehydrogenase, putative	5	6	10	13
TVAG_125360	disulfide oxidoreductase, putative	2	3	4	13
TVAG_049830	disulfide oxidoreductase, putative	22	7	3	14
TVAG_067400	elongation factor 1-alpha, putative	0	2	0	4
TVAG_003900	Ferredoxin 1	4	2	3	3
TVAG_043060	fructose-bisphosphate aldolase, putative	3	3	0	2
TVAG_244120	gelsolin, putative	3	3	4	4
TVAG_074640	glucosylceramidase, putative	10	6	4	0
TVAG_285890	glucosylceramidase, putative	7	0	0	5
TVAG_072100	glutamate dehydrogenase, putative	0	9	19	41
TVAG_047990	glutaminyl-tRNA synthetase, putative	7	2	6	9
TVAG_146910	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	3	0	1	9
TVAG_044510	heat shock protein 70 (HSP70)-4, putative	2	0	0	3
TVAG_336320	Hydroxylamine reductase, putative	108	92	25	34
TVAG_206500	Hydroxylamine reductase, putative	16	0	0	7
TVAG_161300	iron superoxide dismutase A, putative	16	13	1	9

TVAG_219770	macrophage migration inhibitory factor, mif, putative	3	8	3	4
TVAG_381310	malate and lactate dehydrogenase, putative	3	4	0	2
TVAG_009460	malic enzyme, putative	3	0	3	0
TVAG_266630	methionine-tRNA synthetase, putative	0	2	0	4
TVAG_216360	NADPH cytochrome P450, putative	7	15	4	7
TVAG_419590	ornithine cyclodeaminase, putative	2	4	27	19
TVAG_026290	oxysterol-binding protein, putative	6	1	16	33
TVAG_351310	plastin, putative	71	42	121	139
TVAG_492250	Profilin	29	22	41	39
TVAG_459130	Profilin	22	18	7	12
TVAG_159160	Profilin	35	0	41	45
TVAG_100620	Profilin	47	31	46	0
TVAG_127180	purine nucleoside phosphorylase, putative	5	1	27	34
TVAG_144720	retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3,5-cyclic phosphodiesterase, putative	4	3	1	4
TVAG_337230	superoxide dismutase [fe], putative	23	0	7	0
TVAG_120340	superoxide dismutase [mn], putative	22	22	0	12
TVAG_039980	superoxide dismutase, putative	25	17	3	6

TVAG_485570	synaptotagmin, putative	10	2	1	3
TVAG_117900	synaptotagmin, putative	2	0	0	2
TVAG_086470	thioredoxin f-type, putative	2	5	0	7
TVAG_418970	thioredoxin m(mitochondrial)-type, putative	7	5	2	3
TVAG_389740	thioredoxin, putative	4	3	1	3
TVAG_125500	thioredoxin, putative	5	9	3	4
TVAG_339630	thioredoxin, putative	2	2	0	2
TVAG_272910	transaldolase total2, putative	15	13	6	15
TVAG_276410	translation elongation factor, putative	3	0	5	7
TVAG_197820	translation initiation inhibitor, putative	16	13	3	7
TVAG_035410	translation initiation inhibitor, putative	22	30	24	18
TVAG_024980	ubiquitin fusion degradaton protein, putative	9	6	3	4
TVAG_019240	ubiquitin, putative	3	3	0	3

**Tabella S 2:Elenco delle proteine identificate nel secreto a pH 7.0 SpC: Spectral Counts**

Protein ID	Protein Name	SpC I a	SpC I b	SpC II a	SpC II b
TVAG_198430	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative	12	9	21	21
TVAG_454380	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative	11	7	24	22
TVAG_462940	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative	6	12	13	13
TVAG_251260	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative	0	7	18	2
TVAG_414300	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative	3	0	0	3
TVAG_240750	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme, putative	0	2	0	3
TVAG_495030	5->3 exoribonuclease, putative	2	1	0	3
TVAG_051160	60S acidic ribosomal protein P0, putative	3	2	36	27
TVAG_262730	60S ribosomal protein L14, putative	1	2	3	4
TVAG_140290	60S ribosomal protein L27e, putative	2	3	21	12
TVAG_021390	AAA ATPase, putative	0	2	2	1
TVAG_192620	actin depolymerizing factor, putative	15	10	13	7
TVAG_054030	actin, putative	15	12	6	9
TVAG_210320	adenosylhomocysteinase, putative	146	118	32	30

TVAG_407250	adenylyl cyclase-associated protein, putative	14	9	32	25
TVAG_228780	alcohol dehydrogenase, putative	16	16	36	36
TVAG_327470	alcohol dehydrogenase, putative	41	41	8	8
TVAG_344880	alcohol dehydrogenase, putative	9	6	27	25
TVAG_422780	alcohol dehydrogenase, putative	15	9	2	1
TVAG_245190	aldo-keto reductase, putative	30	23	5	2
TVAG_411870	aldo-keto reductase, putative	10	12	5	6
TVAG_484570	alkyl hydroperoxide reductase, subunit C, putative	0	10	14	12
TVAG_075420	alkyl hydroperoxide reductase, subunit C, putative	3	6	9	9
TVAG_129060	alpha-amylase, putative	0	2	5	8
TVAG_057060	alpha-amylase, putative	0	3	6	5
TVAG_183300	aminotransferase class V, putative	22	14	2	5
TVAG_121610	apoptosis inducing factor, putative	0	3	13	9
TVAG_087140	arp2/3, putative	2	3	9	15
TVAG_036010	A-type flavoprotein	6	2	2	2
TVAG_239310	bollus pemphigoid antigen, putative	76	80	177	146
TVAG_118780	calmodulin, putative	15	7	5	4
TVAG_261970	carbamate kinase, putative	11	8	20	16

TVAG_088050	chaperonin, putative	2	2	0	3
TVAG_467970	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	109	85	22	0
TVAG_298080	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	49	41	3	3
TVAG_202090	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	53	41	4	4
TVAG_057000	Clan CA, family C1, papain-like cysteine peptidase	76	62	26	20
TVAG_090100	Clan CA, family C1, papain-like cysteine peptidase	86	55	8	7
TVAG_426660	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase	71	57	12	11
TVAG_385340	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase	35	31	5	8
TVAG_272260	Clan IH, family I25, phytocystatin-like peptidase inhibitor	0	2	1	4
TVAG_106750	Clan M-, family M49, dipeptidylpeptidase III-like metallopeptidase	23	27	27	37
TVAG_008880	Clan MA, family M1, aminopeptidase N-like metallopeptidase	9	6	9	28
TVAG_477180	Clan MA, family M3, oligopeptidase A-like metallopeptidase	13	21	0	22
TVAG_064330	Clan MA, family M8, leishmanolysin-like metallopeptidase	0	10	5	8
TVAG_087590	Clan ME, family M16, insulinase-like metallopeptidase	10	13	22	21
TVAG_386080	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	16	18	14	16
TVAG_437930	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	19	12	0	19
TVAG_403460	Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	7	4	0	2
TVAG_056190	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	22	16	2	3



TVAG_224980	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	21	10	3	1
TVAG_090090	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	15	10	0	4
TVAG_369020	clathrin heavy chain, putative	2	0	39	19
TVAG_369030	clathrin heavy chain, putative	4	2	26	26
TVAG_402260	coactosin, putative	6	6	9	8
TVAG_150940	coactosin, putative	0	5	7	6
TVAG_245580	conserved hypothetical protein	286	231	19	0
TVAG_425470	conserved hypothetical protein	226	206	35	29
TVAG_529190	conserved hypothetical protein	198	159	39	30
TVAG_038420	conserved hypothetical protein	3	3	167	138
TVAG_059980	conserved hypothetical protein	98	81	34	19
TVAG_157940	conserved hypothetical protein	11	7	102	84
TVAG_300840	conserved hypothetical protein	0	4	100	95
TVAG_293660	conserved hypothetical protein	78	57	13	7
TVAG_154680	conserved hypothetical protein	0	5	70	72
TVAG_321740	conserved hypothetical protein	46	44	18	11
TVAG_349040	conserved hypothetical protein	0	2	38	71
TVAG_487100	conserved hypothetical protein	9	13	16	14

TVAG_371800	conserved hypothetical protein	22	27	0	2
TVAG_261950	conserved hypothetical protein	9	11	12	15
TVAG_196620	conserved hypothetical protein	19	13	11	7
TVAG_420480	conserved hypothetical protein	0	2	4	46
TVAG_088640	conserved hypothetical protein	21	17	2	2
TVAG_494990	conserved hypothetical protein	0	3	23	16
TVAG_208990	conserved hypothetical protein	8	13	6	3
TVAG_383370	conserved hypothetical protein	8	10	4	2
TVAG_140200	conserved hypothetical protein	8	13	0	4
TVAG_248050	conserved hypothetical protein	8	6	2	3
TVAG_265530	conserved hypothetical protein	10	4	7	6
TVAG_410350	conserved hypothetical protein	5	6	7	4
TVAG_224210	conserved hypothetical protein	7	7	0	2
TVAG_351790	conserved hypothetical protein	8	6	3	4
TVAG_150040	conserved hypothetical protein	2	1	8	7
TVAG_260830	conserved hypothetical protein	3	1	3	6
TVAG_328570	conserved hypothetical protein	1	2	4	2
TVAG_180840	conserved hypothetical protein	5	3	2	2

TVAG_441080	conserved hypothetical protein	0	6	0	2
TVAG_224220	conserved hypothetical protein	0	6	0	3
TVAG_100720	conserved hypothetical protein	2	2	2	0
TVAG_150280	conserved hypothetical protein	0	2	1	2
TVAG_415010	conserved hypothetical protein	1	2	0	3
TVAG_377380	conserved hypothetical protein	1	2	0	10
TVAG_181560	conserved hypothetical protein	2	1	0	2
TVAG_477640	conserved hypothetical protein	0	15	0	22
TVAG_444970	conserved hypothetical protein	6	0	0	33
TVAG_021420	coronin, putative	11	6	4	3
TVAG_062520	cyclophilin, putative	11	4	7	8
TVAG_147790	cysteine/methionine metabolism pyridoxal-5-phosphate enzymes, putative	9	4	3	5
TVAG_474980	dihydrolipoamide dehydrogenase, putative	32	18	27	26
TVAG_125360	disulfide oxidoreductase, putative	9	5	12	9
TVAG_263800	disulfide oxidoreductase, putative	0	2	4	4
TVAG_464170	enolase, putative	38	25	20	56
TVAG_043500	enolase, putative	0	16	18	47
TVAG_329460	enolase, putative	0	15	0	44

TVAG_120370	Extracellular ribonuclease precursor, putative	0	2	13	9
TVAG_058050	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	2	3	4	4
TVAG_103780	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	3	1	4	5
TVAG_293540	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	3	1	3	3
TVAG_206040	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	2	2	4	2
TVAG_267300	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	2	1	2	0
TVAG_127250	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase	6	4	5	8
TVAG_013010	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase	5	3	7	7
TVAG_403280	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase	3	1	3	0
TVAG_003900	Ferredoxin 1	6	7	2	2
TVAG_360700	fructose-bisphosphate aldolase, putative	40	29	104	96
TVAG_300000	fructose-bisphosphate aldolase, putative	0	28	100	95
TVAG_038440	fructose-bisphosphate aldolase, putative	27	22	66	64
TVAG_099490	glucose kinase, putative	1	3	2	2
TVAG_178210	glucose-1-phosphate thymidyltransferase, putative	0	3	1	4
TVAG_061930	glucose-6-phosphate isomerase, putative	96	55	16	58
TVAG_047990	glutaminyI-tRNA synthetase, putative	6	7	9	5
TVAG_146910	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	10	10	0	78

TVAG_348330	glycogen phosphorylase, putative	8	9	38	71
TVAG_044510	heat shock protein 70 (HSP70)-4, putative	32	10	1	14
TVAG_158990	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B, putative	15	10	15	14
TVAG_210380	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, putative	8	4	11	8
TVAG_014920	histone H4, putative	1	3	14	8
TVAG_336320	Hydroxylamine reductase, putative	99	79	13	17
TVAG_035610	Intracellular protein transport protein USO1, putative	2	0	2	0
TVAG_161300	iron superoxide dismutase A, putative	10	12	3	3
TVAG_190450	kakapo, putative	136	143	172	214
TVAG_334040	leucyl-tRNA synthetase, putative	8	7	6	6
TVAG_219770	macrophage migration inhibitory factor, mif, putative	6	6	3	8
TVAG_381310	malate and lactate dehydrogenase, putative	13	18	12	7
TVAG_193000	malate and lactate dehydrogenase, putative	4	2	5	3
TVAG_239990	malate dehydrogenase, putative	0	7	177	146
TVAG_253650	malate dehydrogenase, putative	22	19	42	48
TVAG_204360	malate dehydrogenase, putative	19	13	25	24
TVAG_171090	malate dehydrogenase, putative	5	0	0	14
TVAG_238830	malic enzyme, putative	57	37	27	47

TVAG_491670	malic enzyme, putative	18	19	9	26
TVAG_228520	malic enzyme, putative	17	17	10	0
TVAG_266630	methionine-tRNA synthetase, putative	6	5	1	8
TVAG_358360	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative	47	36	9	10
TVAG_292690	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative	30	0	7	9
TVAG_407170	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative	0	17	5	7
TVAG_381690	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative	2	1	1	2
TVAG_216360	NADPH cytochrome P450, putative	7	8	8	6
TVAG_036210	nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative	0	2	1	5
TVAG_417090	neurofilament triplet M protein, putative	0	3	0	3
TVAG_462280	nicotinate phosphoribosyltransferase, putative	13	9	2	3
TVAG_293370	nucleoside diphosphate kinase, putative	5	4	8	0
TVAG_167320	nucleoside diphosphate kinase, putative	2	0	5	4
TVAG_041310	ornithine carbamoyltransferase, putative	23	25	9	3
TVAG_419590	ornithine cyclodeaminase, putative	32	27	10	9
TVAG_026290	oxysterol-binding protein, putative	19	16	2	3
TVAG_137880	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, ppia, putative	10	11	17	9
TVAG_476140	peptidylprolyl isomerase, putative	4	3	3	3

TVAG_165610	peroxiredoxin, putative	4	1	11	8
TVAG_114310	peroxiredoxins, prx-1, prx-2, prx-3, putative	19	17	19	20
TVAG_139300	phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative	65	52	0	48
TVAG_310250	phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative	67	57	18	0
TVAG_364620	phosphofructokinase, putative	26	18	0	27
TVAG_430830	phosphofructokinase, putative	0	18	26	0
TVAG_205910	phosphoglucomutase, putative	38	29	118	106
TVAG_054830	phosphoglucomutase, putative	28	0	73	67
TVAG_268050	phosphoglycerate kinase, putative	25	11	16	34
TVAG_383940	phosphoglycerate kinase, putative	0	11	4	33
TVAG_113710	phosphoglycerate mutase, putative	3	1	0	13
TVAG_099570	phosphoserine aminotransferase, putative	0	14	2	3
TVAG_351310	plastin, putative	82	64	14	25
TVAG_045340	polyadenylate-binding protein, putative	7	5	5	10
TVAG_100620	Profilin	29	32	24	22
TVAG_492250	Profilin	21	28	23	16
TVAG_159160	Profilin	24	29	23	0
TVAG_459130	Profilin	8	13	6	3

TVAG_127180	purine nucleoside phosphorylase, putative	20	15	22	12
TVAG_454490	purine nucleoside phosphorylase, putative	13	13	11	13
TVAG_081630	purine nucleoside phosphorylase, putative	10	8	6	7
TVAG_373720	pyruvate kinase, putative	2	0	21	14
TVAG_015950	pyruvate kinase, putative	3	3	9	5
TVAG_126970	RAB GDP-dissociation inhibitor, putative	21	19	1	5
TVAG_490150	Rho GDP-dissociation inhibitor, putative	4	2	6	8
TVAG_043470	RNA-binding protein, putative	8	5	6	9
TVAG_318870	spermatogenesis associated factor, putative	2	1	1	29
TVAG_049140	superoxide dismutase [fe], putative	0	5	9	5
TVAG_120340	superoxide dismutase [mn], putative	19	19	13	9
TVAG_039980	superoxide dismutase, putative	17	14	11	8
TVAG_272910	transaldolase total2, putative	21	18	6	3
TVAG_212020	transketolase, putative	3	1	0	20
TVAG_276410	translation elongation factor, putative	60	35	20	98
TVAG_035410	translation initiation inhibitor, putative	12	13	6	5
TVAG_096350	triosephosphate isomerase, putative	47	28	36	36
TVAG_497370	triosephosphate isomerase, putative	42	0	33	0



TVAG_369470	ubiquitin-activating enzyme E1, putative	4	2	5	8
TVAG_369480	ubiquitin-activating enzyme E1, putative	2	2	2	3
TVAG_133060	UDP- glucose pyrophosphorylase, putative	6	4	0	12
TVAG_156680	vab10 spectraplakin, putative	8	4	0	12
TVAG_108510	vacuolar sorting protein vps29, putative	0	2	1	3
TVAG_124870	WD-repeat protein, putative	15	16	5	9
TVAG_222320	WD-repeat protein, putative	6	0	0	10
TVAG_333620	WD-repeatcontaining protein, putative	4	2	1	2

### Analisi predizione di secrezione alternativa tramite SecretomeP

**Tabella S 3: Proteine del secreto a pH 5.8 con predizione di secrezione alternativa tramite SecretomeP**

<b>IDs</b>	<b>Protein name</b>	<b>SecretomeP Score</b>
TVAG_010780	beta-hexosaminidase B, putative	0.655
TVAG_014160	60S ribosomal protein L12, putative	0.785
TVAG_019240	ubiquitin, putative	0.79
TVAG_035410	translation initiation inhibitor, putative	0.621
TVAG_043060	fructose-bisphosphate aldolase, putative	0.526
TVAG_044240	adaptin, alpha/gamma/epsilon, putative	0.568
TVAG_059980	conserved hypothetical protein	0.527
TVAG_074640	glucosylceramidase, putative	0.594
TVAG_088640	conserved hypothetical protein	0.723
TVAG_100720	conserved hypothetical protein	0.806
TVAG_125500	thioredoxin, putative	0.621
TVAG_135190	cytidine deaminase, putative	0.625
TVAG_146680	Clan CA, family C1, cathepsin L-like cysteine peptidase	0.62
TVAG_150220	conserved hypothetical protein	0.637
TVAG_150280	conserved hypothetical protein	0.557
TVAG_152520	conserved hypothetical protein	0.547
TVAG_177320	conserved hypothetical protein	0.61
TVAG_181560	conserved hypothetical protein	0.759
TVAG_197820	translation initiation inhibitor, putative	0.547
TVAG_205920	alpha-amylase, putative	0.544
TVAG_206500	Hydroxylamine reductase, putative	0.56
TVAG_209010	Clan CA, family C40, NlpC/P60 superfamily cysteine peptidase	0.846
TVAG_219770	macrophage migration inhibitory factor, mif, putative	0.848

<b>IDs</b>	<b>Protein name</b>	<b>SecretomeP Score</b>
TVAG_242510	conserved hypothetical protein	0.533
TVAG_248050	conserved hypothetical protein	0.751
TVAG_254350	calponin/transgelin, putative	0.533
TVAG_266630	methionine-tRNA synthetase, putative	0.627
TVAG_268070	conserved hypothetical protein	0.721
TVAG_272260	Clan IH, family I25, phytocystatin-like peptidase inhibitor	0.706
TVAG_272910	transaldolase total2, putative	0.562
TVAG_277870	conserved hypothetical protein	0.848
TVAG_285890	glucosylceramidase, putative	0.556
TVAG_293660	conserved hypothetical protein	0.533
TVAG_321740	conserved hypothetical protein	0.617
TVAG_328570	conserved hypothetical protein	0.543
TVAG_339630	thioredoxin, putative	0.558
TVAG_351790	conserved hypothetical protein	0.594
TVAG_373190	conserved hypothetical protein	0.53
TVAG_383310	conserved hypothetical protein	0.758
TVAG_385340	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase	0.762
TVAG_389740	thioredoxin, putative	0.67
TVAG_436700	beta-amylase, putative	0.654
TVAG_453300	conserved hypothetical protein	0.614
TVAG_473170	calcium binding protein, putative	0.654
TVAG_474980	dihydrolipoamide dehydrogenase, putative	0.642
TVAG_484050	conserved hypothetical protein	0.655
TVAG_529190	conserved hypothetical protein	0.507

**Tabella S 4: Proteine del secreto a pH 7.0 con predizione di secrezione alternativa tramite SecretomeP**

<b>IDs</b>	<b>Protein name</b>	<b>SecretomeP Score</b>
TVAG_008880	Clan MA, family M1, aminopeptidase N-like metallopeptidase	0.525
TVAG_013010	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase	0.579
TVAG_021390	AAA ATPase, putative	0.664
TVAG_035410	translation initiation inhibitor, putative	0.621
TVAG_036010	A-type flavoprotein	0.536
TVAG_036210	nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative	0.743
TVAG_038440	fructose-bisphosphate aldolase, putative	0.508
TVAG_041310	ornithine carbamoyltransferase, putative	0.549
TVAG_043470	RNA-binding protein, putative	0.516
TVAG_056190	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	0.602
TVAG_057060	alpha-amylase, putative	0.625
TVAG_059980	conserved hypothetical protein	0.527
TVAG_061930	glucose-6-phosphate isomerase, putative	0.66
TVAG_088640	conserved hypothetical protein	0.723
TVAG_090090	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	0.573
TVAG_099490	glucose kinase, putative	0.503
TVAG_100720	conserved hypothetical protein	0.806
TVAG_120370	Extracellular ribonuclease precursor, putative	0.742
TVAG_121610	apoptosis inducing factor, putative	0.534
TVAG_126970	RAB GDP-dissociation inhibitor, putative	0.523
TVAG_127250	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase	0.544
TVAG_140200	conserved hypothetical protein	0.743

<b>IDs</b>	<b>Protein name</b>	<b>SecretomeP Score</b>
TVAG_147790	cysteine/methionine metabolism pyridoxal-5-phosphate enzymes, putative	0.62
TVAG_150040	conserved hypothetical protein	0.579
TVAG_150280	conserved hypothetical protein	0.557
TVAG_150940	coactosin, putative	0.615
TVAG_167320	nucleoside diphosphate kinase, putative	0.706
TVAG_171090	malate dehydrogenase, putative	0.517
TVAG_180840	conserved hypothetical protein	0.506
TVAG_181560	conserved hypothetical protein	0.759
TVAG_196620	conserved hypothetical protein	0.659
TVAG_206040	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	0.513
TVAG_210380	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, putative	0.857
TVAG_219770	macrophage migration inhibitory factor, mif, putative	0.848
TVAG_222320	WD-repeat protein, putative	0.51
TVAG_224210	conserved hypothetical protein	0.576
TVAG_224980	Clan MH, family M20, peptidase T-like metallopeptidase	0.601
TVAG_239990	malate dehydrogenase, putative	0.553
TVAG_240750	4-methyl-5(B-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis enzyme, putative	0.677
TVAG_248050	conserved hypothetical protein	0.751
TVAG_260830	conserved hypothetical protein	0.586
TVAG_261970	carbamate kinase, putative	0.51
TVAG_262730	60S ribosomal protein L14, putative	0.749
TVAG_263800	disulfide oxidoreductase, putative	0.598
TVAG_265530	conserved hypothetical protein	0.816
TVAG_266630	methionine-tRNA synthetase, putative	0.627
TVAG_267300	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	0.554

<b>IDs</b>	<b>Protein name</b>	<b>SecretomeP Score</b>
TVAG_272260	Clan IH, family I25, phytocystatin-like peptidase inhibitor	0.706
TVAG_272910	transaldolase total2, putative	0.562
TVAG_292690	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative	0.629
TVAG_293370	nucleoside diphosphate kinase, putative	0.679
TVAG_293540	Family T1, proteasome alpha subunit, threonine peptidase	0.563
TVAG_293660	conserved hypothetical protein	0.533
TVAG_321740	conserved hypothetical protein	0.617
TVAG_328570	conserved hypothetical protein	0.543
TVAG_344880	alcohol dehydrogenase, putative	0.507
TVAG_348330	glycogen phosphorylase, putative	0.501
TVAG_351790	conserved hypothetical protein	0.594
TVAG_358360	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative	0.52
TVAG_360700	fructose-bisphosphate aldolase, putative	0.505
TVAG_377380	conserved hypothetical protein	0.524
TVAG_385340	Clan CD, family C13, legumain-like cysteine peptidase	0.762
TVAG_402260	coactosin, putative	0.557
TVAG_403280	Family T1, proteasome beta subunit, threonine peptidase	0.712
TVAG_407170	myo-inositol-1 phosphate synthase, putative	0.633
TVAG_414300	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative	0.516
TVAG_415010	conserved hypothetical protein	0.514
TVAG_420480	conserved hypothetical protein	0.563
TVAG_454490	purine nucleoside phosphorylase, putative	0.518
TVAG_462280	nicotinate phosphoribosyltransferase, putative	0.509
TVAG_462940	14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha, putative	0.51
TVAG_474980	dihydrolipoamide dehydrogenase, putative	0.642
TVAG_477640	conserved hypothetical protein	0.52

<b>IDs</b>	<b>Protein name</b>	<b>SecretomeP Score</b>
TVAG_529190	conserved hypothetical protein	0.507

## Blast con le proteine del database Exocarta

**Tabella S 5: Elenco delle proteine secrete a pH 5.8 presenti nel database di proteine esosomiali Exocarta**

TVAG ID	Exocarta DB ID	e-value	score
TVAG_009460	Q86NT5_DROME	3.00E-21	100
TVAG_010780	HEXB_MOUSE	6.00E-39	160
TVAG_014160	RL12_MOUSE	5.00E-42	167
TVAG_019240	RL40_DROME	2.00E-51	197
TVAG_024980	UFD1_DROME	1.00E-19	95.5
TVAG_026290	OSBL1_MOUSE	8.00E-16	82.8
TVAG_026740	BCAT1_HUMAN	6.00E-43	172
TVAG_035410	UK114_RAT	2.00E-25	111
TVAG_039980	SODM_HORSE	2.00E-22	102
TVAG_044240	AP4E1_MOUSE	2.00E-63	242
TVAG_044510	HSP7C_RAT	0	825
TVAG_047990	SYEP_DROME	3.00E-109	394
TVAG_049830	O77266_DROME	5.00E-26	117
TVAG_054030	ACT2_DROME	2.00E-175	613
TVAG_057000	CATL1_MOUSE	4.00E-58	223
TVAG_067400	EF1A1_RAT	0	644
TVAG_072100	DHE4_HUMAN	1.00E-32	139
TVAG_074640	GLCM_HUMAN	1.00E-37	155
TVAG_086470	Q9VRP3_DROME	2.00E-11	65.1
TVAG_090100	CATL1_MOUSE	2.00E-55	213
TVAG_117900	SYT5_MOUSE	8.00E-12	66.2
TVAG_118780	TNNC2_MOUSE	6.00E-11	64.7
TVAG_120340	SODM_MOUSE	4.00E-20	95.5
TVAG_125500	Q9VUG9_DROME	3.00E-13	70.9
TVAG_135190	CDD_HUMAN	4.00E-30	127



TVAG_144720	PDE6D_HUMAN	1.00E-30	129
TVAG_146680	CATL1_RAT	1.00E-30	131
TVAG_146910	G3PT_HUMAN	9.00E-58	221
TVAG_161300	SODM_RAT	1.00E-23	107
TVAG_192620	CADF_DROME	7.00E-18	87
TVAG_197820	UK114_RAT	1.00E-16	82.4
TVAG_202090	CATL_DROME	5.00E-67	252
TVAG_210320	SAHH_RAT	9.00E-130	461
TVAG_215920	PLBL1_RAT	1.00E-51	202
TVAG_216360	NCPR_RAT	3.00E-11	64.7
TVAG_219770	MIF_SHEEP	6.00E-11	63.5
TVAG_228780	O97479_DROME	2.00E-12	71.2
TVAG_235410	VMA5A_HUMAN	3.00E-27	121
TVAG_244120	GELS_DROME	1.00E-36	151
TVAG_245190	AKCL2_MOUSE	3.00E-50	196
TVAG_254350	CNN3_HUMAN	1.00E-22	103
TVAG_266630	SYMM_HUMAN	1.00E-98	358
TVAG_272910	TALDO_MOUSE	5.00E-94	342
TVAG_276410	EF2_HUMAN	0	1044
TVAG_285890	GLCM_HUMAN	9.00E-34	142
TVAG_298080	CATL_DROME	7.00E-65	245
TVAG_327470	HOT_HUMAN	4.00E-10	63.9
TVAG_328570	Q9VV60_DROME	9.00E-30	129
TVAG_337230	SODM_HORSE	4.00E-23	105
TVAG_339630	Q9VRP3_DROME	2.00E-10	65.1
TVAG_347440	PA24D_MOUSE	1.00E-12	71.2
TVAG_351310	PLSI_MOUSE	9.00E-120	428
TVAG_373190	AP2B1_RAT	4.00E-146	516
TVAG_381310	MDHC_MOUSE	2.00E-67	253

TVAG_385340	LGMN_MOUSE	6.00E-37	152
TVAG_386080	PEPD_HUMAN	4.00E-80	296
TVAG_389740	Q9VUG9_DROME	5.00E-13	70.5
TVAG_405240	SAHH_RAT	6.00E-127	452
TVAG_407250	CAP1_RAT	9.00E-17	86.3
TVAG_410260	CATL2_HUMAN	1.00E-63	241
TVAG_418970	Q9VRP3_DROME	1.00E-11	65.5
TVAG_419590	CRYM_MOUSE	4.00E-27	120
TVAG_426660	LGMN_MOUSE	3.00E-35	147
TVAG_432040	Q9VS02_DROME	4.00E-32	137
TVAG_453300	CPN2_MOUSE	3.00E-09	62.8
TVAG_467970	CATL_DROME	4.00E-66	249
TVAG_473170	TNNC2_MOUSE	3.00E-09	58.9
TVAG_474980	Q9VVL7_DROME	5.00E-11	66.2
TVAG_485570	MCTP1_HUMAN	8.00E-20	96.3
TVAG_486140	PSMD4_DROME	3.00E-19	94.4

**Tabella S 6: Elenco delle proteine secrete a pH 5.8 presenti nel database di proteine esosomiali Exocarta**

<b>Tvag ID</b>	<b>Exocarta DB ID</b>	<b>e-value</b>	<b>score</b>
TVAG_008880	Q8IRH0_DROME	5.00E-76	284
TVAG_013010	PSB5_MOUSE	2.00E-59	226
TVAG_014920	H4_RAT	2.00E-35	144
TVAG_015950	KPYM_HUMAN	3.00E-74	277
TVAG_021390	VPS4B_HUMAN	5.00E-96	349
TVAG_021420	CORO6_HUMAN	4.00E-41	167
TVAG_026290	OSBL1_MOUSE	8.00E-16	82.8

TVAG_035410	UK114_RAT	2.00E-25	111
TVAG_036210	NACA_HUMAN	7.00E-19	90.9
TVAG_039980	SODM_HORSE	2.00E-22	102
TVAG_041310	OTC_MOUSE	2.00E-58	223
TVAG_043470	HNRDL_HUMAN	1.00E-11	67.4
TVAG_043500	ENOG_HUMAN	4.00E-93	339
TVAG_044510	HSP7C_RAT	0	825
TVAG_047990	SYEP_DROME	3.00E-109	394
TVAG_049140	SODM_RAT	3.00E-20	95.9
TVAG_051160	RLA0_DROME	4.00E-45	179
TVAG_054030	ACT2_DROME	2.00E-175	613
TVAG_054830	PGM2_HUMAN	4.00E-141	499
TVAG_057000	CATL1_MOUSE	4.00E-58	223
TVAG_057060	MAL1_DROME	3.00E-11	68.2
TVAG_058050	PSA4_MOUSE	8.00E-63	238
TVAG_061930	G6PI_HUMAN	4.00E-21	101
TVAG_062520	PPID_MOUSE	1.00E-57	220
TVAG_064330	LMLN_DROME	2.00E-09	62.8
TVAG_075420	PRDX2_HUMAN	2.00E-62	236
TVAG_081630	Q8IMQ8_DROME	1.00E-11	68.2
TVAG_087140	ARPC2_DROME	5.00E-33	139
TVAG_087590	PREP_DROME	3.00E-71	268
TVAG_088050	CH60_DROME	4.00E-133	473
TVAG_090100	CATL1_MOUSE	2.00E-55	213
TVAG_096350	TPIS_HUMAN	5.00E-58	222
TVAG_099570	SERC_MOUSE	2.00E-77	286
TVAG_103780	PSA2_DROME	9.00E-63	237
TVAG_106750	DPP3_DROME	1.00E-88	325
TVAG_108510	Q9VPX5_DROME	2.00E-43	172

TVAG_113710	PGAM2_HUMAN	4.00E-81	298
TVAG_114310	PRDX2_HUMAN	1.00E-62	236
TVAG_118780	TNNC2_MOUSE	6.00E-11	64.7
TVAG_120340	SODM_MOUSE	4.00E-20	95.5
TVAG_121610	AIFM3_HUMAN	9.00E-18	90.5
TVAG_124870	CORO6_RAT	2.00E-76	284
TVAG_126970	GDIA_RAT	3.00E-114	409
TVAG_127250	PSB6_HUMAN	3.00E-41	166
TVAG_133060	Q8IPJ6_DROME	7.00E-58	223
TVAG_137880	PPID_MOUSE	1.00E-65	246
TVAG_139300	PCKG_DROME	3.00E-171	599
TVAG_140200	FBX11_MOUSE	5.00E-11	67.8
TVAG_140290	RL27_RAT	3.00E-18	88.2
TVAG_146910	G3PT_HUMAN	9.00E-58	221
TVAG_147790	CGL_RAT	4.00E-77	286
TVAG_150940	Q8IQX5_DROME	1.00E-19	92.8
TVAG_156680	ACTN4_MOUSE	2.00E-60	231
TVAG_161300	SODM_RAT	1.00E-23	107
TVAG_165610	PRDX3_RAT	5.00E-09	58.2
TVAG_167320	Q9VY27_DROME	3.00E-23	104
TVAG_171090	MDHC_MOUSE	3.00E-70	263
TVAG_178210	GMPPB_DROME	1.00E-48	191
TVAG_180840	TCTP_HUMAN	2.00E-09	58.9
TVAG_183300	SERC_MOUSE	2.00E-77	286
TVAG_190450	ACTN2_MOUSE	2.00E-56	219
TVAG_192620	CADF_DROME	7.00E-18	87
TVAG_193000	MDHC_MOUSE	4.00E-84	309
TVAG_198430	1433E_DROME	1.00E-36	150
TVAG_202090	CATL_DROME	5.00E-67	252

TVAG_204360	MDHC_RAT	3.00E-84	310
TVAG_205910	PGM2_HUMAN	1.00E-138	491
TVAG_206040	PSA1_MOUSE	4.00E-61	231
TVAG_210320	SAHH_RAT	9.00E-130	461
TVAG_210380	ROA1_HUMAN	7.00E-11	64.7
TVAG_212020	TKTL2_MOUSE	2.00E-37	155
TVAG_216360	NCPR_RAT	3.00E-11	64.7
TVAG_219770	MIF_SHEEP	6.00E-11	63.5
TVAG_222320	CORO6_RAT	3.00E-77	286
TVAG_224980	CNDP2_HUMAN	5.00E-12	70.5
TVAG_228520	Q86NT5_DROME	4.00E-13	73.6
TVAG_228780	O97479_DROME	2.00E-12	71.2
TVAG_238830	MAOX_MOUSE	6.00E-99	359
TVAG_239310	ACTN1_HUMAN	1.00E-63	243
TVAG_239990	MDHC_RAT	1.00E-73	274
TVAG_240750	Q9VA37_DROME	3.00E-28	122
TVAG_245190	AKCL2_MOUSE	3.00E-50	196
TVAG_251260	1433E_DROME	6.00E-47	184
TVAG_253650	MDHC_RAT	5.00E-81	298
TVAG_262730	RL14_RAT	3.00E-16	81.3
TVAG_263800	O77266_DROME	4.00E-23	108
TVAG_266630	SYMM_HUMAN	1.00E-98	358
TVAG_267300	PSA6_RAT	4.00E-51	199
TVAG_268050	PGK1_HUMAN	3.00E-133	472
TVAG_272910	TALDO_MOUSE	5.00E-94	342
TVAG_276410	EF2_HUMAN	0	1044
TVAG_292690	INO1_MOUSE	8.00E-156	548
TVAG_293370	Q9VY27_DROME	7.00E-22	100
TVAG_293540	PSA5_DROME	9.00E-69	257

TVAG_298080	CATL_DROME	7.00E-65	245
TVAG_310250	PCKGC_HUMAN	2.00E-170	597
TVAG_318870	TERA_DROME	0	916
TVAG_327470	HOT_HUMAN	4.00E-10	63.9
TVAG_328570	Q9VV60_DROME	9.00E-30	129
TVAG_329460	ENOG_HUMAN	9.00E-98	355
TVAG_333620	WDR1_RAT	3.00E-67	254
TVAG_334040	SYLC_MOUSE	0	682
TVAG_344880	DHSO_HUMAN	1.00E-17	88.6
TVAG_348330	PYG_DROME	0	634
TVAG_349040	SDA1_HUMAN	1.00E-40	166
TVAG_351310	PLSI_MOUSE	9.00E-120	428
TVAG_358360	INO1_DROME	6.00E-145	511
TVAG_364620	K6PP_MOUSE	1.00E-15	82.8
TVAG_369020	CLH1_HUMAN	6.00E-136	482
TVAG_369030	CLH1_HUMAN	8.00E-114	409
TVAG_369470	UBA1_RAT	2.00E-119	427
TVAG_369480	UBA1_MOUSE	6.00E-36	149
TVAG_373720	KPYM_HUMAN	2.00E-76	284
TVAG_377380	FBX11_RAT	2.00E-10	66.6
TVAG_381310	MDHC_MOUSE	2.00E-67	253
TVAG_381690	UXS1_HUMAN	5.00E-23	106
TVAG_383940	PGK1_HUMAN	6.00E-135	478
TVAG_385340	LGMN_MOUSE	6.00E-37	152
TVAG_386080	PEPD_HUMAN	4.00E-80	296
TVAG_402260	Q8IQX5_DROME	1.00E-19	93.2
TVAG_403280	PSB2_HUMAN	2.00E-37	153
TVAG_403460	PEPD_HUMAN	2.00E-46	184
TVAG_407170	INO1_DROME	4.00E-154	542

TVAG_407250	CAP1_RAT	9.00E-17	86.3
TVAG_411870	ALDR_RAT	2.00E-47	186
TVAG_419590	CRYM_MOUSE	4.00E-27	120
TVAG_422780	HOT_RAT	2.00E-13	74.7
TVAG_426660	LG MN_MOUSE	3.00E-35	147
TVAG_430830	K6PP_MOUSE	8.00E-16	82.8
TVAG_437930	PEPD_HUMAN	4.00E-83	306
TVAG_454380	1433E_DROME	7.00E-47	184
TVAG_462280	PNCB_DROME	2.00E-116	417
TVAG_462940	1433E_RAT	6.00E-50	194
TVAG_464170	ENOG_HUMAN	1.00E-94	345
TVAG_467970	CATL_DROME	4.00E-66	249
TVAG_474980	Q9VVL7_DROME	5.00E-11	66.2
TVAG_476140	FKB12_DROME	1.00E-28	122
TVAG_477180	THOP1_HUMAN	8.00E-76	283
TVAG_484570	PRDX2_HUMAN	8.00E-64	240
TVAG_490150	Q9VW59_DROME	3.00E-09	58.9
TVAG_491670	Q86NT5_DROME	6.00E-20	96.3
TVAG_495030	XRN1_MOUSE	2.00E-80	298
TVAG_497370	TPIS_HUMAN	6.00E-59	224

## REFERENCES

1. **Donnè, A.**, *Animacules observés dans le matières purulente set le produit des sécrétions des organes genitaux de l'homme et de la femme.* . Sci Paris, 1836. 3: p. 385-386.
2. **Sutcliffe, S., et al.**, *Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis--a proposed molecular mechanism.* PLoS Pathog, 2012. 8(8): p. e1002801.
3. **Honigberg B.M., K.V.M.**, *Structure of Trichomonas vaginalis Donnè.* J.Parasitol., 1964. 50: p. 345-364.
4. **Zubacova, Z., Z. Cimburek, and J. Tachezy**, *Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes.* Mol Biochem Parasitol, 2008. 161(1): p. 49-54.
5. **Honigberg B.M., B.G.**, *Trichomonads parasitic in humans. Structure.* Ed Springer-verlag, 1990: p. 5-35.
6. **Muller, M.**, *The hydrogenosome.* J Gen Microbiol, 1993. 139(12): p. 2879-89.
7. **Nielsen, M.H. and N.H. Diemer**, *The size, density, and relative area of chromatic granules ("hydrogenosomes") in Trichomonas vaginalis Donne from cultures in logarithmic and stationary growth.* Cell Tissue Res, 1976. 167(4): p. 461-5.
8. **Lindmark, D.G. and M. Muller**, *Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate Tritrichomonas foetus, and its role in pyruvate metabolism.* J Biol Chem, 1973. 248(22): p. 7724-8.
9. **Dessi, D., et al.**, *Long-term survival and intracellular replication of Mycoplasma hominis in Trichomonas vaginalis cells: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection.* Infect Immun, 2005. 73(2): p. 1180-6.
10. **Dessi, D., et al.**, *Mycoplasma hominis and Trichomonas vaginalis: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites.* Front Biosci, 2006. 11: p. 2028-34.
11. **Vancini, R.G. and M. Benchimol**, *Entry and intracellular location of Mycoplasma hominis in Trichomonas vaginalis.* Arch Microbiol, 2008. 189(1): p. 7-18.
12. **Carlton, J.M., et al.**, *Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen Trichomonas vaginalis.* Science, 2007. 315(5809): p. 207-12.
13. **Muller, M.**, *Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists.* Biosystems, 1992. 28(1-3): p. 33-40.
14. **Steinbuchel, A. and M. Muller**, *Glycerol, a metabolic end product of Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas foetus.* Mol Biochem Parasitol, 1986. 20(1): p. 45-55.



15. **Steinbuchel, A. and M. Muller**, *Anaerobic pyruvate metabolism of Tritrichomonas foetus and Trichomonas vaginalis hydrogenosomes*. Mol Biochem Parasitol, 1986. 20(1): p. 57-65.
16. **Lindmark D.G., E.B.L., Halberg L.A., and Dinbergs I.D.**, *Carbohydrate, energy and hydrogenosomal metabolism of Tritrichomonas foetus and Trichomonas vaginalis*. J. Protozool, 1989. 36: p. 214-216.
17. **Beach, D.H., et al.**, *Fatty acid and sterol metabolism of cultured Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas foetus*. Mol Biochem Parasitol, 1990. 38(2): p. 175-90.
18. **Knodler, L.A., M.R. Edwards, and P.J. Schofield**, *The intracellular amino acid pools of Giardia intestinalis, Trichomonas vaginalis, and Crithidia luciliae*. Exp Parasitol, 1994. 79(2): p. 117-25.
19. **Narcisi, E.M. and W.E. Secor**, *In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant Trichomonas vaginalis*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. 40(5): p. 1121-5.
20. **Yoon, K., J.S. Ryu, and D.Y. Min**, *[Cytotoxicity of lymphokine activated peritoneal macrophages against Trichomonas vaginalis]*. Kisaengchunghak Chapchi, 1991. 29(4): p. 381-8.
21. **Morada, M., et al.**, *Hydrogenosome-localization of arginine deiminase in Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol, 2011. 176(1): p. 51-4.
22. **Lee J.J., S.A.T.**, *Protocols in protozoology* 1992. Society of Protozoologists.
23. **Diamond L. S., H.D.H., and Cunnick C. C.**, *A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba*. . Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg, 1978. 72: p. 431-432.
24. **Diamond, L.S.**, *The establishment of various Trichomonads of animals and man in axenic cultures*. J. Parasitol., 1957. 43: p. 488-490.
25. **Van der Pol, B.**, *Trichomonas vaginalis infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention*. Clin Infect Dis, 2007. 44(1): p. 23-5.
26. **Schwebke, J.R. and D. Burgess**, *Trichomoniasis*. Clin Microbiol Rev, 2004. 17(4): p. 794-803, table of contents.
27. **Bachmann, L.H., et al.**, *Trichomonas vaginalis Genital Infections: Progress and Challenges*. Clinical Infectious Diseases, 2011. 53(suppl 3): p. S160-S172.
28. **Van Der Pol, B., et al.**, *Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of Trichomonas vaginalis infection among adolescent women*. J Infect Dis, 2005. 192(12): p. 2039-44.

29. **Su-LinKe**, *Antibody to Trichomonas vaginalis in human cervicovaginal secretions*. Infect. Immun., 1982. 37: p. 852-857.
30. **Krieger, J.N., et al.**, *Characteristics of Trichomonas vaginalis isolates from women with and without colpitis macularis*. J Infect Dis, 1990. 161(2): p. 307-11.
31. **Lehker, M.W. and J.F. Alderete**, *Iron regulates growth of Trichomonas vaginalis and the expression of immunogenic trichomonad proteins*. Mol Microbiol, 1992. 6(1): p. 123-32.
32. **Wolner-Hanssen, P., et al.**, *Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis*. JAMA, 1989. 261(4): p. 571-6.
33. **Adu-Sarkodie, Y., et al.**, *Comparison of latex agglutination, wet preparation, and culture for the detection of Trichomonas vaginalis*. Sex Transm Infect, 2004. 80(3): p. 201-3.
34. **Krieger, J.N., et al.**, *Diagnosis of trichomoniasis. Comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens*. JAMA, 1988. 259(8): p. 1223-7.
35. **Fleury, F.J.**, *Diagnosis of Trichomonas vaginalis infection*. JAMA, 1979. 242(23): p. 2556-7.
36. **Diaz, N., et al.**, *Rapid detection of coinfections by Trichomonas vaginalis, Mycoplasma hominis, and Ureaplasma urealyticum by a new multiplex polymerase chain reaction*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010. 67(1): p. 30-6.
37. **Riley, D.E., et al.**, *Development of a polymerase chain reaction-based diagnosis of Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 1992. 30(2): p. 465-72.
38. **Rappelli, P., et al.**, *Sequence of cDNA coding for a 65 kDa adhesive protein for the specific detection of Trichomonas vaginalis by PCR*. FEMS Microbiol Lett, 1995. 129(1): p. 21-6.
39. **Masue, N., et al.**, *System for simultaneous detection of 16 pathogens related to urethritis to diagnose mixed infection*. Int J Urol, 2007. 14(1): p. 39-42.
40. **Krieger, J.N., et al.**, *Prokaryotic DNA sequences in patients with chronic idiopathic prostatitis*. J Clin Microbiol, 1996. 34(12): p. 3120-8.
41. **Gardner, W.A., Jr., D.E. Culberson, and B.D. Bennett**, *Trichomonas vaginalis in the prostate gland*. Arch Pathol Lab Med, 1986. 110(5): p. 430-2.
42. **Tiwara, S., et al.**, *High prevalence of trichomonal vaginitis and chlamydial cervicitis among a rural population in the highlands of Papua New Guinea*. P N G Med J, 1996. 39(3): p. 234-8.
43. **Skerk, V., et al.**, *Aetiology of chronic prostatitis*. Int J Antimicrob Agents, 2002. 19(6): p. 471-4.
44. **Martinez-Garcia, F., et al.**, *Protozoan infections in the male genital tract*. J Urol, 1996. 156(2 Pt 1): p. 340-9.

45. **Van Der Pol, B., et al.,** *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis*, 2008. 197(4): p. 548-54.
46. **McClelland, R.S., et al.,** *Infection with Trichomonas vaginalis increases the risk of HIV-1 acquisition.* *J Infect Dis*, 2007. 195(5): p. 698-702.
47. **Pereira-Neves, A. and M. Benchimol,** *Phagocytosis by Trichomonas vaginalis: new insights.* *Biol Cell*, 2007. 99(2): p. 87-101.
48. **Yadav, M., et al.,** *Cysteine proteinase 30 in clinical isolates of T. vaginalis from symptomatic and asymptomatic infected women.* *Experimental Parasitology*, 2007. 116(4): p. 399-406.
49. **Fichorova, R.N.,** *Impact of T. vaginalis infection on innate immune responses and reproductive outcome.* *J Reprod Immunol*, 2009. 83(1-2): p. 185-9.
50. **J.N Krieger, K.S.W., A.A.F Mahmoud,** *Trichomoniasis.* *Tropical and Geographical Medicine* McGraw Hill, New York 1990: p. pp. 358–365.
51. **Ames, B.N., L.S. Gold, and W.C. Willett,** *The causes and prevention of cancer.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(12): p. 5258-65.
52. **Coussens, L.M. and Z. Werb,** *Inflammation and cancer.* *Nature*, 2002. 420(6917): p. 860-7.
53. **Gram, I.T., et al.,** *Trichomonas vaginalis (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III.* *Cancer Causes Control*, 1992. 3(3): p. 231-6.
54. **Chakrabarti, R.N., et al.,** *Cytologic evidence of the association of different infective lesions with dysplastic changes in the uterine cervix.* *Eur J Gynaecol Oncol*, 1992. 13(5): p. 398-402.
55. **Yap, E.H., et al.,** *Serum antibodies to Trichomonas vaginalis in invasive cervical cancer patients.* *Genitourin Med*, 1995. 71(6): p. 402-4.
56. **Yusof, A.M. and S. Kumar,** *Phenotypic 'variant' forms of Trichomonas vaginalis trophozoites from cervical neoplasia patients.* *Exp Parasitol*, 2012. 131(3): p. 267-73.
57. **Wynder, E.L., K. Mabuchi, and W.F. Whitmore, Jr.,** *Epidemiology of cancer of the prostate.* *Cancer*, 1971. 28(2): p. 344-60.
58. **Smith, C.J.G.W.A.J.,** *Current Concept and Approches to the Study of Prostate Cancer* Alan Liss, Inc NY USA 1987: p. 317-325.
59. **Gardner, W.A., Jr. ; Culberson, D.E. ,** *Phatology of urogenital trichomoniasis in men* *Trichomonads Parasitic in Humans*, 1990. Honigberg BM(Springer-Verlag, NY, USA): p. 291-296.
60. **Krieger, J.N.,** *Trichomoniasis in men: old issues and new data.* *Sex Transm Dis*, 1995. 22(2): p. 83-96.

61. **Soper, D.**, *Trichomoniasis: under control or undercontrolled?* Am J Obstet Gynecol, 2004. 190(1): p. 281-90.
62. **Sutcliffe, S.**, *Plasma Antibodies against Trichomonas vaginalis and Subsequent Risk of Prostate Cancer.* Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2006. 15(5): p. 939-945.
63. **Coutts, W.E., E. Silva-Inzunza, and B. Tallman**, *Genitourinary complications of non-gonococcal urethritis and trichomoniasis in males.* Urol Int, 1959. 9: p. 189-208.
64. **Allen, E.J., L.B. Wood, I.H.** , *Clinical and bacteriologic observation in Trichomonas vaginitis.* Am. J. Obstet. Gynecol., 1940. 30: p. 565-570.
65. **Kostic, P.K.**, *[The importance of study of trichomonas in fection in the male].* Urol Int, 1959. 9: p. 171-7.
66. **Watt, L. and R.F. Jennison**, *Incidence of Trichomonas vaginalis in marital partners.* Br J Vener Dis, 1960. 36: p. 163-6.
67. **Weston, T.E. and C.S. Nicol**, *Natural History of Trichomonal Infection in Males.* Br J Vener Dis, 1963. 39: p. 251-7.
68. **Sutcliffe, S., et al.**, *Plasma antibodies against Trichomonas vaginalis and subsequent risk of prostate cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. 15(5): p. 939-45.
69. **Mitteregger, D., et al.**, *High detection rate of Trichomonas vaginalis in benign hyperplastic prostatic tissue.* Med Microbiol Immunol, 2012. 201(1): p. 113-6.
70. **Kucknoor, A.S., V. Mundodi, and J.F. Alderete**, *Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of Trichomonas vaginalis genes.* Infect Immun, 2005. 73(10): p. 6472-8.
71. **Checkoway, H., et al.**, *Medical, life-style, and occupational risk factors for prostate cancer.* Prostate, 1987. 10(1): p. 79-88.
72. **Sutcliffe, S., et al.**, *Trichomonosis and subsequent risk of prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial.* Int J Cancer, 2009. 124(9): p. 2082-7.
73. **Stark, J.R., et al.**, *Prospective study of Trichomonas vaginalis infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study.* J Natl Cancer Inst, 2009. 101(20): p. 1406-11.
74. **Sutcliffe, S.**, *Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: review of historical and emerging hypotheses.* Future Oncol, 2010. 6(8): p. 1289-311.
75. **Groom, H.C., et al.**, *No evidence for infection of UK prostate cancer patients with XMRV, BK virus, Trichomonas vaginalis or human papilloma viruses.* PLoS ONE, 2012. 7(3): p. e34221.
76. **Krieger, J.N.**, *Urologic aspects of trichomoniasis.* Invest Urol, 1981. 18(8): p. 411-7.

77. **William Glen Liston, R.L.**, *TRICHOMONAS VAGINALIS INFESTATION*. Br J Vener Dis. 1940 : , 1940(January; 16(1-2)): p. 34-55.
78. **M.J.Houge**, *The effect of Trichomonas vaginalis on tissue-culture cells*. Am. J. Hyg. 37: p. 142-152.
79. **Christian RT, M.N., Ludovici PP, Riley GM**, *A study of Trichomonas vaginalis in human cell culture*. Am J Obstet Gynecol., 1963. 85: p. 947-54.
80. **Kotcher E., H.A.C.**, *Cultivation of Trichomonas vaginalis Donné 1837, in association with tissue cultures*. J. Parasitol, 1957. 43: p. 39.
81. **Honogberg B.M., E.A.**, *Preliminary observations on pathogenicity of Trichomonas vaginalis for cell cultures*. Proc. Int. Congr. Protozool, 1961. 1: p. 568-569.
82. **Ovcinikov N.M., D.V.V., Turanova E.N., Yashkova G.N.**, *Further studies of Trichomonas vaginalis with transmission and scanning electron microscopy*. Br. J. Vener. Dis, 1975. 51: p. 357-375.
83. **Heath, J.P.**, *Behaviour and pathogenicity of Trichomonas vaginalis in epithelial cells*. Br. J. Vener. Dis., 1981. 57: p. 106-117.
84. **Alderete, J.F. and E. Pearlman**, *Pathogenic Trichomonas vaginalis cytotoxicity to cell culture monolayers*. Br J Vener Dis, 1984. 60(2): p. 99-105.
85. **Alderete, J.F. and G.E. Garza**, *Specific nature of Trichomonas vaginalis parasitism of host cell surfaces*. Infect Immun, 1985. 50(3): p. 701-8.
86. **Alderete, J.F., R. Arroyo, and M.W. Lehker**, *Identification of fibronectin as a receptor for bacterial cytoadherence*. Methods Enzymol, 1994. 236: p. 318-33.
87. **Alderete, J.F., et al.**, *Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in Trichomonas vaginalis cytoadherence*. Mol Microbiol, 1995. 17(1): p. 69-83.
88. **Arroyo, R., J. Engbring, and J.F. Alderete**, *Molecular basis of host epithelial cell recognition by Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol, 1992. 6(7): p. 853-62.
89. **da Costa, R.F., et al.**, *Trichomonas vaginalis perturbs the junctional complex in epithelial cells*. Cell Res, 2005. 15(9): p. 704-16.
90. **Lehker, M.W. and J.F. Alderete**, *Biology of trichomonosis*. Curr Opin Infect Dis, 2000. 13(1): p. 37-45.
91. **Dailey, D.C., T.H. Chang, and J.F. Alderete**, *Characterization of Trichomonas vaginalis haemolysis*. Parasitology, 1990. 101 Pt 2: p. 171-5.

92. **Lehker, M.W., et al.,** *Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for Trichomonas vaginalis.* j exp med, 1990. 171(6): p. 2165-70.
93. **Adegaju, A.a.M., O. A,** *Cytoadherence and pathogenesis of Trichomonas vaginalis.* Scientific Research and Essays, 2008. 3: p. 132-138.
94. **Pereira-Neves A., B.M.,** *Phagocytosis by Trichomonas vaginalis- New insights.* Biol.Cell. , 2006. 99: p. 87-101.
95. **Fiori, P.L., P. Rappelli, and M.F. Addis,** *The flagellated parasite Trichomonas vaginalis: new insights into cytopathogenicity mechanisms.* Microbes Infect, 1999. 1(2): p. 149-56.
96. **Arroyo, R., et al.,** *Signalling of Trichomonas vaginalis for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence.* Mol Microbiol, 1993. 7(2): p. 299-309.
97. **Ryan, C.M., N. de Miguel, and P.J. Johnson,** *Trichomonas vaginalis: current understanding of host-parasite interactions.* Essays Biochem, 2011. 51: p. 161-75.
98. **Alderete, J.F., et al.,** *Enzymes on microbial pathogens and Trichomonas vaginalis: molecular mimicry and functional diversity.* Cell Microbiol, 2001. 3(6): p. 359-70.
99. **Addis, M.F., P. Rappelli, and P.L. Fiori,** *Host and tissue specificity of Trichomonas vaginalis is not mediated by its known adhesion proteins.* Infect Immun, 2000. 68(7): p. 4358-60.
100. **Hirt, R.P., et al.,** *Trichomonas vaginalis surface proteins: a view from the genome.* Trends Parasitol, 2007. 23(11): p. 540-7.
101. **Lama, A., et al.,** *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of Trichomonas vaginalis.* Infect Immun, 2009. 77(7): p. 2703-11.
102. **Choromanski L., B.D.A., Nordin J.H., Pan A.A., and Honigberg B.M. ,** *Further studies on the surface saccharides in Trichomonas vaginalis strains by fluorescein-conjugated lectins.* Z. Parasitenkd, 1985. 71: p. 443-458.
103. **de Carli G.A., B.P., Rott M., da Silva A., and Wendorff A. ,** *Hemolytic activity of various strains and clones of Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas suis.* Rev. Latinoam. Microbiol., 1994. 36: p. 207-211.
104. **Benchimol, M. and W. de Souza,** *Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with Trichomonas vaginalis and Tritrichomonas foetus.* Parasitol Res, 1995. 81(6): p. 459-64.
105. **Dias Filho B.P., A.A.F., de Souza W., Esteves M.J., and Angluster J. ,** *Cell surface saccharide differences in drug-susceptible and drug-resistant strains of Trichomonas vaginalis.* Microbios, 1992. 71: p. 55-64.

106. **Singh, B.N., et al.,** *Adhesion of Tritrichomonas foetus to bovine vaginal epithelial cells.* Infect Immun, 1999. 67(8): p. 3847-54.
107. **Singh, B.N.,** *Lipophosphoglycan-like glycoconjugate of Tritrichomonas foetus and Trichomonas vaginalis.* Mol Biochem Parasitol, 1993. 57(2): p. 281-94.
108. **Ryan, C.M., et al.,** *Chemical structure of Trichomonas vaginalis surface lipoglycan: a role for short galactose (beta1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction.* J Biol Chem, 2011. 286(47): p. 40494-508.
109. **Bastida-Corcuera, F.D., et al.,** *Trichomonas vaginalis lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells.* Eukaryot Cell, 2005. 4(11): p. 1951-8.
110. **Fichorova, R.N., et al.,** *Trichomonas vaginalis lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells.* Infect Immun, 2006. 74(10): p. 5773-9.
111. **Okumura, C.Y., L.G. Baum, and P.J. Johnson,** *Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite Trichomonas vaginalis.* Cell Microbiol, 2008. 10(10): p. 2078-90.
112. **Sharma, A., et al.,** *Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from Bacteroides forsythus ATCC 43037.* Infect Immun, 1998. 66(12): p. 5703-10.
113. **Crouch, M.L. and J.F. Alderete,** *Trichomonas vaginalis interactions with fibronectin and laminin.* Microbiology, 1999. 145 ( Pt 10): p. 2835-43.
114. **Addis, M.F., et al.,** *Cloning and molecular characterization of a cDNA clone coding for Trichomonas vaginalis alpha-actinin and intracellular localization of the protein.* Infect Immun, 1998. 66(10): p. 4924-31.
115. **Garber, G.E., L.T. Lemchuk-Favel, and W.R. Bowie,** *Isolation of a cell-detaching factor of Trichomonas vaginalis.* J Clin Microbiol, 1989. 27(7): p. 1548-53.
116. **North, M.J.,** *Cysteine endopeptidases of parasitic protozoa.* Methods Enzymol, 1994. 244: p. 523-39.
117. **North, M.J.,** *Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms.* Microbiol Rev, 1982. 46(3): p. 308-40.
118. **Alderete, J.F., et al.,** *The vagina of women infected with Trichomonas vaginalis has numerous proteinases and antibody to trichomonad proteinases.* Genitourin Med, 1991. 67(6): p. 469-74.

119. **Arroyo, R. and J.F. Alderete**, *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun*, 1989. 57(10): p. 2991-7.
120. **Provenzano, D. and J.F. Alderete**, Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*, 1995. 63(9): p. 3388-95.
121. **Garber, G.E. and W.R. Bowie**, The effect of *Trichomonas vaginalis* and the role of pH on cell culture monolayer viability. *Clin Invest Med*, 1990. 13(2): p. 71-6.
122. **Fiori, P.L., et al.**, *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathog*, 1996. 20(2): p. 109-18.
123. **Fiori, P.L., et al.**, *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiol Lett*, 1993. 109(1): p. 13-8.
124. **Munford, R.S., P.O. Sheppard, and P.J. O'Hara**, Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res*, 1995. 36(8): p. 1653-63.
125. **Addis, M.F., et al.**, 2-D PAGE and MS analysis of proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics*, 2009. 9(18): p. 4329-4339.
126. **Tanca, A., et al.**, Proteomic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded lung neuroendocrine tumor samples from hospital archives. *Journal of Proteomics*, 2011. 74(3): p. 359-370.
127. **Petersen, T.N., et al.**, SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 2011. 8(10): p. 785-6.
128. **Bendtsen, J.D., et al.**, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004. 340(4): p. 783-95.
129. **Mathivanan, S., et al.**, ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(Database issue): p. D1241-4.
130. **Mathivanan, S. and R.J. Simpson**, ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, 2009. 9(21): p. 4997-5000.
131. **Camacho, C., et al.**, BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 2009. 10: p. 421.
132. **Aloy, P. and R.B. Russell**, Interrogating protein interaction networks through structural biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(9): p. 5896-901.
133. **Aloy, P. and R.B. Russell**, InterPreTS: protein interaction prediction through tertiary structure. *Bioinformatics*, 2003. 19(1): p. 161-2.
134. **Addis, M.F., et al.**, Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP<sup>+</sup> dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb Pathog*, 1997. 23(1): p. 55-61.



135. **Kucknoor, A.S., V. Mundodi, and J.F. Alderete,** *The proteins secreted by Trichomonas vaginalis and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65.* Cell Microbiol, 2007. 9(11): p. 2586-97.
136. **Huang, K.Y., et al.,** *A proteome reference map of Trichomonas vaginalis.* Parasitol Res, 2009. 104(4): p. 927-33.
137. **De Jesus, J.B., et al.,** *Application of two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for proteomic analysis of the sexually transmitted parasite Trichomonas vaginalis.* Journal of Mass Spectrometry, 2007. 42(11): p. 1463-1473.
138. **Kucknoor, A., V. Mundodi, and J.F. Alderete,** *Trichomonas vaginalis adherence mediates differential gene expression in human vaginal epithelial cells.* Cell Microbiol, 2005. 7(6): p. 887-97.
139. **Hirt, R.P., et al.,** *Trichomonas vaginalis pathobiology new insights from the genome sequence.* Adv Parasitol, 2011. 77: p. 87-140.
140. **Klemba, M. and D.E. Goldberg,** *Biological roles of proteases in parasitic protozoa.* Annu Rev Biochem, 2002. 71: p. 275-305.
141. **Jose Batista De Jesus, †,‡, et al.,** *Cysteine Peptidase Expression in Trichomonas vaginalis Isolates Displaying High- and Low-Virulence Phenotypes.* Journal of Proteome Research, 2009. 8, : p. 1555–1564.
142. **Coombs, G.H., et al.,** *The amitochondriate eukaryote Trichomonas vaginalis contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system.* J Biol Chem, 2004. 279(7): p. 5249-56.
143. **Sen A, C.N., Akbar MA, Nandi N, Das P.,** *The 29-kilodalton thiol-dependent peroxidase of Entamoeba histolytica is a factor involved in pathogenesis and survival of the parasite during oxidative stress.* 2007.
144. **Ramon-Luing, L.A., et al.,** *Immunoproteomics of the active degradome to identify biomarkers for Trichomonas vaginalis.* Proteomics, 2010. 10(3): p. 435-44.
145. **Fiori, P.L., et al.,** *Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by Trichomonas vaginalis.* Infect Immun, 1997. 65(12): p. 5142-8.
146. **Silverman, J.M., et al.,** *Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani.* Genome Biology, 2008. 9(2): p. R35.
147. **Hozbor, D., et al.,** *Release of outer membrane vesicles from Bordetella pertussis.* Curr Microbiol, 1999. 38(5): p. 273-8.

148. **Kouokam, J.C., et al.,** *Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic Escherichia coli.* Infect Immun, 2006. 74(4): p. 2022-30.
149. **Lindmark, B., et al.,** *Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from Campylobacter jejuni.* BMC Microbiol, 2009. 9: p. 220.
150. **Vidakovics, M.L., et al.,** *B cell activation by outer membrane vesicles--a novel virulence mechanism.* PLoS Pathog, 2010. 6(1): p. e1000724.
151. **Conroy, H., L. Mawhinney, and S.C. Donnelly,** *Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link.* Qjm, 2010. 103(11): p. 831-836.
152. **Tang, W.M., X. Gou, and Q.X. Liu,** *[Expression of macrophage migration inhibition factor (MIF) in serum of patients with prostate cancer and its clinical significance].* Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2011. 27(1): p. 97-8.
153. **Meyer-Siegler, K.L., et al.,** *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence.* Genes Immun, 2007. 8(8): p. 646-52.
154. **Meyer-Siegler, K.L., et al.,** *Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells.* J Immunol, 2006. 177(12): p. 8730-9.
155. **Calandra, T. and T. Roger,** *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity.* Nature Reviews Immunology, 2003. 3(10): p. 791-800.
156. **Younis, A.E., et al.,** *Characterization of a secreted macrophage migration inhibitory factor homologue of the parasitic nematode Strongyloides acting at the parasite-host cell interface.* Microbes Infect, 2012. 14(3): p. 279-89.
157. **Stamps, S.L., M.C. Fitzgerald, and C.P. Whitman,** *Characterization of the role of the amino-terminal proline in the enzymatic activity catalyzed by macrophage migration inhibitory factor.* Biochemistry, 1998. 37(28): p. 10195-202.
158. **Vermeire, J.J., et al.,** *Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes.* Trends in Parasitology, 2008. 24(8): p. 355-363.